

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM**  
**QUÍMICA**

**Bianca Bonifácio Monteiro Vieira**

Estudo e caracterização de compostos de inclusão envolvendo o  
fármaco Cloridrato de Biperideno e ciclodextrinas

**Bianca Bonifácio Monteiro Vieira**

Estudo e caracterização de compostos de inclusão envolvendo o  
fármaco Cloridrato de Biperideno e ciclodextrinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação Multicêntrico em Química de Minas  
Gerais como requisito final para obtenção do grau  
de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa

Itajubá, 2021

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado e abençoado durante a caminhada, sempre me proporcionando força e saúde para superar cada dificuldade encontrada.

Ao meu orientador Fred pela confiança, apoio, pela impecável orientação e por ser um exemplo de dedicação e competência.

À Dra. Ivana Silva Lula, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelas medidas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Ressalto minha gratidão pela atenção, empenho em nos ajudar e principalmente pela contribuição para os dados obtidos.

À professora Elgte pelo incentivo para continuar meus estudos e seguir para o mestrado. Ressalto minha gratidão por ter me apresentado ao trabalho do professor Frederico e me apoiado durante todo o processo de ingresso.

Aos meus colegas de laboratório: Diego, Jorge e Flávio pela amizade, apoio durante todo o desenvolvimento da minha pesquisa e por tornarem dias difíceis mais agradáveis.

À minha família, em especial aos meus pais Rita e Volnei por todo apoio, carinho, confiança e paciência durante este período de dificuldades e conquistas. Agradeço também a minha irmã Valesca pela companhia e apoio durante esses anos que moramos juntas em Itajubá.

Ao Alexandre que me acompanhou durante todo o período do mestrado, pelo incentivo, paciência, pelas palavras de conforto, por entender os momentos de ausência, e principalmente por seu amor.

Às minhas melhores amigas Isadora e Jucimara por serem companheiras, protetoras e apesar da distância e dificuldade de nos encontrarmos com frequência, sempre se mantiveram presentes, me apoiando e torcendo pela minha felicidade.

A UNIFEI e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, por toda estrutura disponibilizada para a concretização deste trabalho.

E à CAPES, CNPq e a FAPEMIG pelo fomento à pesquisa e ao CNPq pela bolsa recebida durante o mestrado.

## Resumo

O Cloridrato de Biperideno (BPR) é um fármaco indicado como adjuvante no tratamento da doença de Parkinson, auxiliando no controle de sintomas como tremores e rigidez muscular. Entretanto, o mesmo apresenta importantes efeitos colaterais, além de baixa solubilidade em água e efeito de primeira passagem, causando limitações quanto à biodisponibilidade. Uma forma de contornar estas limitações é a associação do fármaco com ciclodextrinas (CDs) de forma a se obter sistemas supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro. Assim, no presente trabalho os sistemas supramoleculares estabelecidos por interações não covalentes, formados pela associação das moléculas hóspedes,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD), com o fármaco BPR, foram investigados. Os compostos de inclusão no estado sólido para ambos sistemas ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR) foram preparados por liofilização e caracterizados previamente por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR-ATR). Em solução utilizou-se, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), para a obtenção dos coeficientes estequiométricos ( $n$ ), das constantes de associação ( $K_a$ ) e os parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para a confirmação da inclusão. Ainda em solução, o diagrama de solubilidade de fase foi utilizado para estudar o comportamento do processo de inclusão sob a solubilidade do BPR. De acordo com os resultados de ITC o processo de formação dos compostos de inclusão, tanto do sistema HP $\beta$ CD:BPR quanto do sistema  $\beta$ CD:BPR, foi espontâneo e exotérmico, porém, o último obteve uma maior  $K_a$ , indicando interações mais fortes entre as espécies. Além disso, os resultados de ITC indicaram valores de  $n$  correspondentes a uma estequiometria 1:1 para o sistema  $\beta$ CD:BPR enquanto que para o sistema HP $\beta$ CD:BPR foram observados valores fracionados de  $n$ , sugerindo a formação de equilíbrios múltiplos em solução. Já os mapas de correlação 2D-ROESY permitiram confirmar a inclusão do BPR em ambos sistemas, e também mostram a existência de interações mais fortes entre o BPR e a  $\beta$ CD. De forma adicional, os estudos de solubilidade indicaram que a solubilidade dos compostos de inclusão é superior à do fármaco BPR livre, vide o perfil de solubilidade do tipo  $A_L$  obtido para os dois sistemas em estudo.

**Palavras-chaves:** Ciclodextrinas; Cloridrato de Biperideno; Compostos de Inclusão; Sistemas Supramoleculares.

## Abstract

Biperiden Hydrochloride (BPR) is a drug indicated as an adjuvant in the treatment of Parkinson's disease, assisting in managing symptoms such as tremors and muscle stiffness. However, it has a large amount of side effects, in addition to low water solubility and first-pass effect, limiting its bioavailability. One way to overcome these limitations is the use of an association of the drug with cyclodextrins (CDs) in supramolecular host-guest systems. Thus, in the present work, supramolecular systems linked by non-covalent interactions, formed by the association of guest molecules,  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) and Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HP $\beta$ CD), with the drug BPR, were investigated. Solid state inclusion compounds for both systems ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR) were prepared by lyophilization and characterized previously by infrared absorption spectroscopy (FTIR-ATR). In solution, isothermal titration calorimetry (ITC) was used to obtain the stoichiometric coefficients ( $n$ ), the association constants ( $K_a$ ) and the thermodynamic parameters involved in the process. Still in solution the phase solubility diagram was utilized to study the inclusion process on the solubility of the BPR. According to the ITC results, the formation process of inclusion compounds, both the HP $\beta$ CD:BPR and the  $\beta$ CD:BPR system, was spontaneous and exothermic, however, the latter obtained a higher  $K_a$ , indicating stronger interactions between species. Furthermore, the ITC results indicated values of  $n$  corresponding to a 1:1 stoichiometry for the  $\beta$ CD:BPR system while for the HP $\beta$ CD:BPR system fractional values of  $n$  were observed, suggesting the formation of multiple equilibria in solution. The 2D-ROESY correlation maps confirmed the inclusion of BPR for both systems, and also demonstrated the existence of stronger interactions between BPR and  $\beta$ CD. Additionally, solubility studies indicated that the solubility of inclusion compounds is superior in comparison with the free BPR drug, taking by example the AL-type solubility profile obtained for the two systems under study.

**Keywords:** Cyclodextrins; Biperiden Hydrochloride; Inclusion Compounds; Supramolecular Systems.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Fórmula estrutural do Cloridrato de Biperideno (BPR). .....	15
<b>Figura 1.2</b> – Representação estrutural: (a) $\beta$ -ciclodextrina; (b) monômero glicosídico com respectiva identificação dos hidrogênios e carbonos. ....	18
<b>Figura 1.3</b> – Representação esquemática da liberação do fármaco, incluído na cavidade no organismo por deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas endógenas. ....	21
<b>Figura 1.4</b> – Esquema da trajetória da radiação no acessório ATR. ....	23
<b>Figura 1.5</b> – Tipos de perfis dos diagramas de solubilidade de fase. ....	25
<b>Figura 1.6</b> – Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica (Figura adaptada de SONG, ZHANG e HUANG, 2015). ....	28
<b>Figura 1.7</b> – Resultado obtido para a titulação de $\text{CaCl}_2$ $1,00 \text{ mmol.L}^{-1}$ em EDTA $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $25^\circ\text{C}$ . ....	29
<b>Figura 3.1</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para a $\beta\text{CD}$ . ....	41
<b>Figura 3.2</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para a $\text{HP}\beta\text{CD}$ . ....	41
<b>Figura 3.3</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para o fármaco BPR. ....	42
<b>Figura 3.4</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para (a) o BPR, a $\beta\text{CD}$ , o composto de inclusão $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ e a $\text{MM}(\beta\text{CD}:\text{BPR})$ ; (b) o BPR, a $\text{HP}\beta\text{CD}$ , o composto de inclusão $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$ , e a $\text{MM}(\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR})$ . ....	44
<b>Figura 3.5</b> – (a) Espectros de absorção na região do UV-Vis do fármaco BPR nas concentrações variando de $0,5806 \text{ (A1)}$ a $5,8062 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ (A10)}$ ; (b) Curva de calibração com ajuste linear utilizada para determinar a concentração de BPR nas amostras. Os valores estão expressos com a média e o desvio padrão da média, de três réplicas. ....	46
<b>Figura 3.6</b> – Diagrama de solubilidade de fase de BPR na presença de concentrações crescentes de $\beta\text{CD}$ nas temperaturas de $37, 47$ e $57^\circ\text{C}$ . ....	46
<b>Figura 3.7</b> – Diagrama de solubilidade de fase de BPR na presença de concentrações crescentes de $\text{HP}\beta\text{CD}$ nas temperaturas de $37, 47$ e $57^\circ\text{C}$ . ....	47

<b>Figura 3.8</b> – Perfil de titulação a 37 °C de (a) $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 5,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; (b) $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 2,5 mmol.L <sup>-1</sup> . .....	50
<b>Figura 3.9</b> – Perfil de titulação a 37 °C: (a) ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.....	51
<b>Figura 3.10</b> – Perfil de titulação a 47 °C: (a) ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.....	53
<b>Figura 3.11</b> – Perfil de titulação a 57 °C: (a) ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; ■ $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.....	54
<b>Figura 3.12</b> – Gráfico de compensação entálpica/entrópica correspondente ao sistema $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> e BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.....	56
<b>Figura 3.13</b> – Perfil de titulação a 37 °C de (a) HP $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; (b) HP $\beta$ CD 30,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . .....	57
<b>Figura 3.14</b> – Perfil de titulação HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> a 37 °C.....	58
<b>Figura 3.15</b> – Perfil de titulação a 47 °C: (a) ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear. ....	60
<b>Figura 3.16</b> – Perfil de titulação a 57 °C: (a) ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> . (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear. ....	61
<b>Figura 3.17</b> – Gráfico de compensação entálpica/entrópica correspondente ao sistema HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> e BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.....	62
<b>Figura 3.18</b> – Representação estrutural do monômero glicosídico da CD com respectiva identificação dos hidrogênios. ....	63
<b>Figura 3.19</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do BPR a 600 MHz em CDCl <sub>3</sub> . .....	64
<b>Figura 3.20</b> – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do BPR para a região de $\delta$ entre 5,0 a 8,0 ppm. ....	65
<b>Figura 3.21</b> – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do BPR para a região de $\delta$ entre 0,5 a 4,0 ppm. ....	65

<b>Figura 3.22</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ a 600 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio. ....	67
<b>Figura 3.23</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ para a região de $\delta$ entre 4,0 a 8,0 ppm. ....	67
<b>Figura 3.24</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ para a região de $\delta$ entre 0,0 a 4,2 ppm. ....	68
<b>Figura 3.25</b> – Mapa de correlação de RMN 2D-ROESY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do composto de inclusão $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ a 600 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos principais sinais de hidrogênio. ....	69
<b>Figura 3.26</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$ a 600 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio. ....	70
<b>Figura 3.27</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$ para a região de $\delta$ entre 4,5 a 8,0 ppm. ....	71
<b>Figura 3.28</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto de inclusão $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$ para a região de $\delta$ entre 0,0 a 4,4 ppm. ....	71
<b>Figura 3.29</b> – Mapa de correlação de RMN 2D-ROESY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do composto de inclusão $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$ a 600 MHz em $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos principais sinais de hidrogênio. ....	72

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Características adicionais das principais ciclodextrinas naturais.....	19
<b>Tabela 2.1</b> – Esquema de preparo das amostras para a realização do teste de solubilidade de BPR na presença de $\beta$ CD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.....	35
<b>Tabela 2.2</b> – Esquema de preparo das amostras para a realização do teste de solubilidade de BPR na presença de HP $\beta$ CD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C. ....	36
<b>Tabela 3.1</b> – Atribuição das principais bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho para as moléculas $\beta$ CD e HP $\beta$ CD. ....	42
<b>Tabela 3.2</b> – Atribuição das principais bandas do espectro de absorção na região do infravermelho para o fármaco BPR. ....	43
<b>Tabela 3.3</b> – Parâmetros termodinâmicos calculados para os sistemas $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR a 37, 47 e 57 °C.....	48
<b>Tabela 3.4</b> – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas $\beta$ CD 14,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> a 37, 47 e 57 °C.....	51
<b>Tabela 3.5</b> – Valores de K <sub>a</sub> para sistemas envolvendo a $\beta$ CD desfavorecidos pelo aumento da temperatura obtidos por Meira <i>et al.</i> (2018). ....	55
<b>Tabela 3.6</b> – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L <sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> a 37, 47 e 57 °C.....	58
<b>Tabela 3.7</b> – Valores de descolamento químico ( $\delta$ ) para os hidrogênios do isômero majoritário de BPR, a 600 MHz em CDCl <sub>3</sub> . ....	66

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

$\delta$	Deformação angular fora do plano
$\nu$	Estiramento
$\beta$ CD	Beta-ciclodextrina
$\gamma$ CD	Gama-ciclodextrina
$\alpha$ CD	Alfa-ciclodextrina
$\Delta G^\circ$	Varição da energia livre de Gibbs padrão
$\Delta H^\circ$	Varição de entalpia padrão
$\Delta S^\circ$	Varição de entropia padrão
$T\Delta S^\circ$	Termo entrópico
2D	bidimensional
BPR	Cloridrato de Biperideno
CD	Ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
HP $\beta$ CD	Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina
$K_a$	Constante de afinidade
n	Coefficiente estequiométrico
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
ITC	<i>Isothermal titration calorimetric</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROESY	<i>Rotating frame overhauser effect</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visível
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. Doença de Parkinson.....	14
1.1.1. Cloridrato de Biperideno .....	14
1.2. Química Supramolecular .....	16
1.3. Ciclodextrinas .....	18
1.4. Técnicas de caracterização utilizadas .....	22
1.4.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	22
1.4.2. Diagrama de solubilidade de fase .....	23
1.4.3. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível.....	26
1.4.4. Calorimetria de titulação isotérmica.....	27
1.5. Objetivos .....	30
1.5.1. Objetivo Geral .....	30
1.5.2. Objetivos específicos .....	30
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
2.1. Materiais e Reagentes .....	32
2.2. Descrição dos experimentos .....	33
2.2.1. Preparo dos compostos de inclusão .....	33
2.3. Caracterizações .....	34
2.3.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	34
2.3.2. Estudo de solubilidade .....	34
2.3.3. Calorimetria de titulação isotérmica.....	37
2.3.4. Ressonância magnética nuclear .....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>40</b>
3.1. Liofilização dos compostos de inclusão .....	40

3.2.	Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho .....	40
3.3.	Estudo de solubilidade .....	45
3.4.	Calorimetria de titulação isotérmica .....	49
3.4.1.	Sistema $\beta$ CD:BPR .....	49
3.4.2.	Sistema HP $\beta$ CD:BPR .....	57
3.5.	Ressonância magnética nuclear .....	63
3.5.1.	Sistema $\beta$ CD:BPR .....	66
3.5.2.	Sistema HP $\beta$ CD:BPR .....	69
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson, descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico britânico James Parkinson, é uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva, causada pela degeneração do neurotransmissor dopamina, na parte compacta da substância negra. A perda dos neurônios dopaminérgicos começa uma década ou mais antes do aparecimento efetivo dos sintomas, e essa perda continua de modo permanente. As manifestações clínicas começam a aparecer com a degeneração de 70 a 80 % dos neurônios dopaminérgicos, resultando em distúrbios do sistema motor como, por exemplo, rigidez muscular, tremor em repouso, bradicinesia e instabilidade postural (NELSON, BERCHOU e LEWITT, 2005; STANDAERT e GALANTER, 2014).

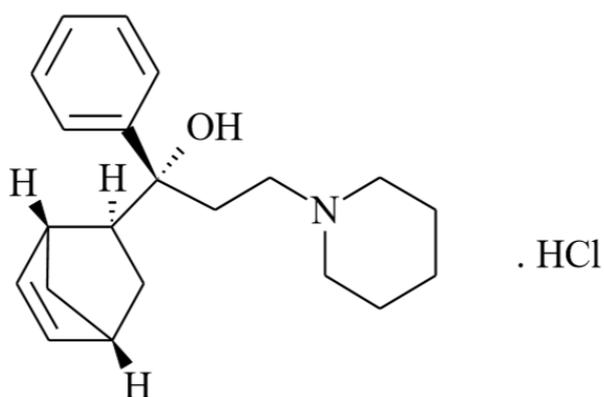
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, afetando cerca de 1 % da população mundial acima de 65 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Este é um distúrbio típico da terceira idade e os mecanismos subjacentes à destruição dos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson ainda não estão totalmente elucidados. A etiologia da doença de Parkinson na maioria dos pacientes é multifatorial, apresentando contribuições de fatores tanto genéticos quanto ambientais (NELSON, BERCHOU e LEWITT, 2005; STANDAERT e GALANTER, 2014).

Todos os tratamentos atualmente disponíveis são sintomáticos, ou seja, eles tratam os sintomas, mas não alteram o processo degenerativo dos neurônios dopaminérgicos. Desta forma, as intervenções farmacológicas, utilizadas recentemente, visam à restauração dos níveis de dopamina no cérebro. Entretanto, fármacos que não afetam diretamente as vias dopaminérgicas, também são usados no tratamento da doença de Parkinson, como, por exemplo, o anticolinérgico Cloridrato de Biperideno. (NELSON, BERCHOU e LEWITT, 2005; STANDAERT e GALANTER, 2014).

### 1.1.1. Cloridrato de Biperideno

O Cloridrato de Biperideno (Figura 1.1), denominado neste texto de BPR, é um fármaco anticolinérgico, de ação predominantemente central, indicado para o tratamento da doença de

Parkinson, auxiliando no controle de sintomas como tremores e rigidez muscular (AKINETON<sup>®</sup>, 2019). Ele é um pó cristalino branco, pouco solúvel em água (0,0043 g.mL<sup>-1</sup> a 25 °C), com fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>ClNO e massa molecular de 347,9 g.mol<sup>-1</sup> (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2017).



**Figura 1.1** – Fórmula estrutural do Cloridrato de Biperideno (BPR).

A via de administração desse fármaco é oral, sendo comercializado em comprimidos de 2 e 4 mg, e a maior dose a ser administrada, descrita em bula, é de 16 mg/dia. O BPR é rapidamente absorvido, mas sua biodisponibilidade é de aproximadamente 33 % (AKINETON<sup>®</sup>, 2019). A baixa biodisponibilidade do fármaco pode estar associada ao metabolismo de primeira passagem no fígado, uma vez que os fármacos administrados por via oral estão sujeitos a esse fenômeno. Nesse processo, as enzimas hepáticas podem inativar uma fração do fármaco ingerido antes que ele atinja a circulação sistêmica, o que pode diminuir significativamente a biodisponibilidade (LA MATTINA e GOLAN, 2014).

Fármacos anticolinérgicos como o BPR apresentam vários efeitos adversos, tais como, boca seca, visão turva, tontura, fadiga, náusea, constipação, retenção urinária, insônia, agitação, confusão, ansiedade, distúrbios de memória, dentre outros (NELSON, BERCHOU e LEWITT, 2005; AKINETON<sup>®</sup>, 2019).

Uma vez que o fármaco supracitado apresenta uma grande quantidade de efeitos colaterais associados à administração por via oral, e considerando a baixa solubilidade do mesmo e o efeito de primeira passagem, o que causa limitações quanto à biodisponibilidade, estudos

envolvendo a associação do Cloridrato de Biperideno e ciclodextrinas podem se tornar uma alternativa interessante no contexto da Química Supramolecular.

## 1.2. Química Supramolecular

A Química Supramolecular é frequentemente definida como a “química além da molécula”, termo este proposto por Jean-Marie-Lehn, Prêmio Nobel em 1987. Juntamente com os pesquisadores Donald J. Cram e Charles J. Pedersen, Lehn mostrou que, assim como existe um campo da Química baseado em moléculas individuais formadas pela associação de átomos através de ligações covalentes, também existe o campo da Química Supramolecular. Esse campo é dedicado aos estudos das supermoléculas, ou seja, entidades de maior complexidade resultantes da associação de duas ou mais espécies mantidas juntas por forças intermoleculares. As interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, são interações intermoleculares que podem estar presentes em um determinado sistema supramolecular (LENH, 1978; DODZIUK, 2002; KATSUHIKO e KUNITAKE, 2006).

Alguns exemplos de sistemas supramoleculares podem ser citados, como a união entre duas fitas de DNA por ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas e por interações eletrostáticas entre os grupos fosfato; o enovelamento de uma proteína em sua conformação nativa, resultado das interações entre os diversos resíduos de aminoácidos; micelas que são formadas por agregados de moléculas anfipáticas unidas por forças de Van der Waals (UHLENHEUER; PETKAU e BRUNSVELD).

Segundo Katsuhiko e Kunitake (2006), a Química Supramolecular pode ser dividida em três partes:

- 1) A química associada ao reconhecimento molecular – consiste na capacidade de uma molécula em reconhecer outra molécula e interagir com esta de forma específica por meio de interações não covalentes. Esse princípio foi proposto por Emil Fisher em 1894, antes mesmo de a Química Supramolecular ser reconhecida como ciência, e foi baseado no mecanismo pelo qual uma enzima reconhece e interage de uma forma particular com um substrato específico, o que é comumente chamado de chave-fechadura.
- 2) A química dos agregados moleculares – consiste na associação de diferentes sistemas supramoleculares independentes, formando um novo composto supramolecular de alta

massa molecular. Esse novo composto, apresenta propriedades específicas e distintas das mesmas presentes nos sistemas isolados de origem.

- 3) A química dos sistemas hóspede-hospedeiro – abrange compostos que são formados a partir da interação de uma molécula hóspede na cavidade da molécula hospedeira mediante forças intermoleculares formando uma só estrutura. Tais compostos são denominados compostos de inclusão, e embora esses sistemas sejam estabilizados por forças relativamente fracas, quando comparadas às ligações covalentes, o efeito somado resulta em uma forte interação entre o hóspede e o hospedeiro.

Atualmente são conhecidos diferentes sistemas supramoleculares envolvendo moléculas hóspedes e hospedeiras na formação de compostos de inclusão com o intuito de modificar propriedades físico-químicas da molécula hóspede, tais como solubilidade, alterar sabores indesejáveis, diminuir efeitos colaterais de fármacos, dentre outros. Esses sistemas são aplicados em diversos segmentos como na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (HEDGES, 1998; DAVIS e BREWSTER, 2004).

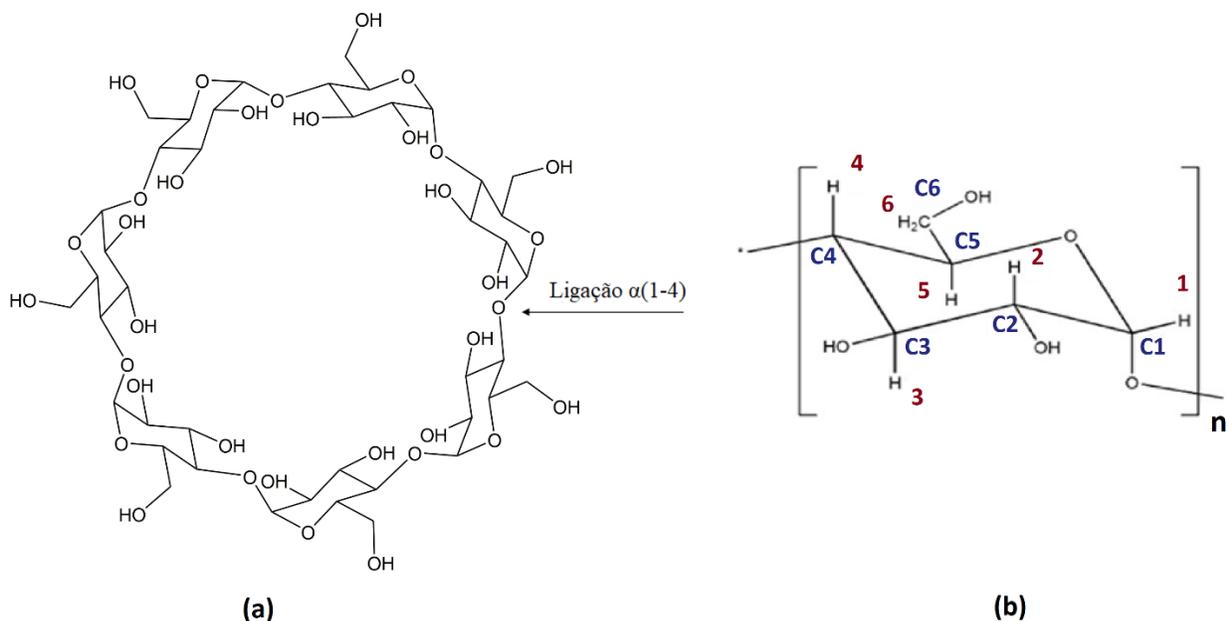
Dos segmentos supracitados destaca-se o setor farmacêutico, na qual estudos vêm sendo realizados com o intuito de aplicar sistemas supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro na liberação de fármacos, com a finalidade de modular mecanismos de liberação, melhorar a absorção e aumentar a estabilidade de fármacos (PASSOS et al., 2012; DE PAULA et al., 2012; NAMGUNG et al., 2014; ZHOU et al., 2019; BAI et al., 2021).

Dentre as moléculas hospedeiras empregadas em sistemas supramoleculares na liberação de fármacos, encontram-se as ciclodextrinas. As ciclodextrinas são capazes de formar compostos de inclusão com um grande número de fármacos, modificando suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas (DAVIS e BREWSTER, 2004; KOLESNICHENKO e ANSLYN, 2017). O uso dessas moléculas na liberação de fármacos tem apresentado resultados satisfatórios nos últimos anos, sendo que cerca de 30 medicamentos já são comercializados utilizando diferentes ciclodextrinas como excipiente nas mais variadas rotas de administração, destacando-se a administração por via oral. Dentre os medicamentos aprovados para a comercialização, que possuem ciclodextrinas como excipientes e são administrados por via oral, pode-se citar como exemplos, os anti-inflamatórios CICLADOL<sup>®</sup> (piroxicam betaciclodextrina) e MAXSULID<sup>®</sup> (nimesulida betaciclodextrina), comercializados no Brasil, e o antifúngico SPORANOX<sup>®</sup>

(itraconazol hydroxypropyl betacyclodextrin), comercializado no continente europeu e nos Estados Unidos da América (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

### 1.3. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) pertencem à classe dos oligossacarídeos cíclicos e são formadas pela união de unidades glicosídicas, as quais, cada monômero, possuem conformação de cadeira e suas unidades são unidas por ligações do tipo  $\alpha$  (1-4) (Figura 1.2). As principais CDs naturais são conhecidas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, compostas de 6, 7 e 8 unidades de glicosídicas, respectivamente. As CDs naturais supracitadas são atualmente obtidas através da digestão enzimática do amido pela ciclodextrina glicosil transferase (CGTase). Esta enzima é mais seletiva do que as usadas anteriormente, o que possibilita o uso das CDs como excipientes farmacêuticos. Adicionalmente, outras características das principais CDs naturais estão descritas na Tabela 1.1 (SZEJTLI, 1998; DEL VALLE, 2004; DAVIS e BREWSTER, 2004; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007, SANTOS et al., 2021).



**Figura 1.2** – Representação estrutural: (a)  $\beta$ -ciclodextrina; (b) monômero glicosídico com respectiva identificação dos hidrogênios e carbonos.

**Tabela 1.1** – Características adicionais das principais ciclodextrinas naturais.

Característica	$\alpha$ CD	$\beta$ CD	$\gamma$ CD
Número de unidades glicosídicas	6	7	8
Massa molecular ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	972	1135	1297
Solubilidade em água, a 25°C ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	145,0	18,5	232,0
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7	6,0	7,5
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura (Å)	7,9	7,9	7,9

Além das CDs naturais, CDs modificadas quimicamente também podem ser preparadas por diferentes rotas sintéticas, com o intuito de se obter moléculas com diferentes propriedades físico-químicas, considerando o produto final que se almeja. De uma forma geral, CDs modificadas são obtidas através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas ligadas ao carbono C6 pelo grupo substituinte de interesse, tais como etila, sulfobutila e hidroxipropila (KHAN et al., 1998; DODZIUK, 2002). Segundo Szejtli (2004), Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD) é uma das CDs modificadas mais relevantes no setor farmacêutico, uma vez que ela é mais solúvel em água ( $> 600 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 25 °C) e apresenta menor toxicidade quando comparada a precursora  $\beta$ CD. A HP $\beta$ CD é encontrada como excipiente em composições farmacêuticas já comercializadas, e aprovada para o uso em formulações com administração por via oral e intravenosa (IRIE e UEKAMA, 1997; SZEJTLI, 2004; BREWSTER e LOFTSSON, 2007).

A partir de dados de cristalografia de raios X, foi observado que, devido às ligações glicosídicas, as CDs possuem uma estrutura relativamente rígida, ocasionando uma geometria comumente descrita como sendo de um cone truncado. Estruturalmente, as CDs apresentam as hidroxilas secundárias, ligadas ao carbono C2 e C3, e a hidroxila primária ligada ao carbono C6, voltadas para o exterior da molécula, o que confere um caráter hidrofílico a região externa da mesma. Já no interior da CD estão presentes os hidrogênios H3 e H5, juntamente com os oxigênios do grupo C-O-C, o que confere um caráter hidrofóbico na cavidade da molécula, permitindo que moléculas hidrofóbicas sejam incluídas nesta cavidade, sendo que o tamanho da cavidade varia

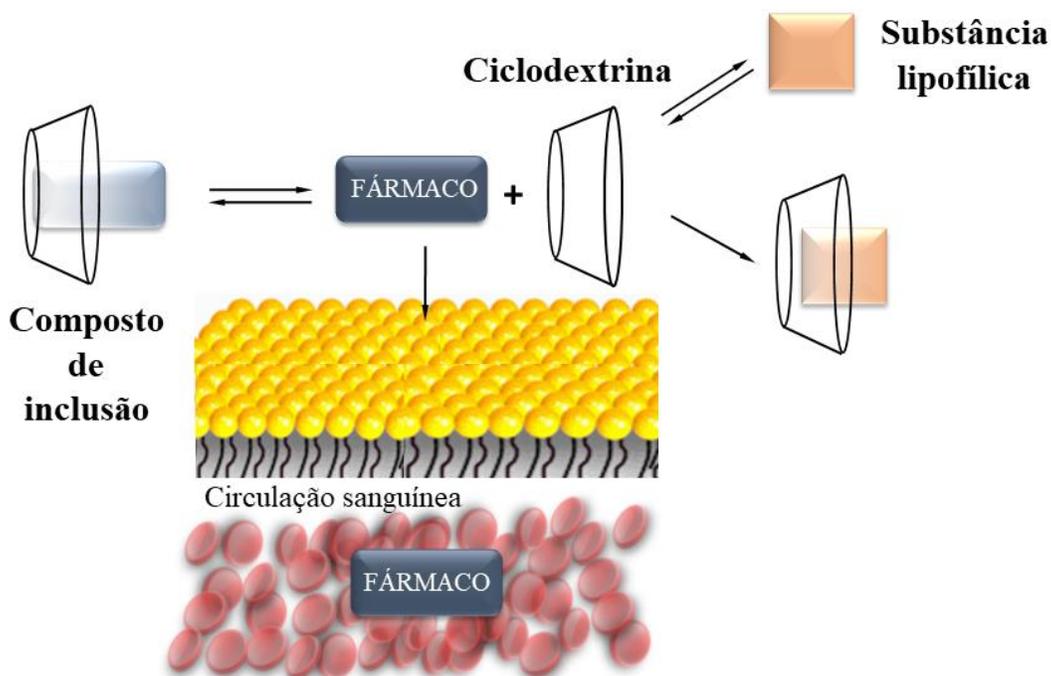
conforme o número de unidades glicosídicas presentes. Tal característica proporciona a essas moléculas a capacidade de formar compostos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas hóspedes (DAVIS e BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004; KOLESNICHENKO e ANSLYN, 2017).

Como mencionado anteriormente, uma das maiores áreas de interesse de pesquisa é a busca por sistemas de liberação de fármacos, uma vez que algumas moléculas usadas em formulações farmacêuticas não são tão eficazes devido à baixa solubilidade, baixa absorção ou ainda a efeitos colaterais associados ao seu uso. Desta forma, o uso de sistemas supramoleculares como os compostos de inclusão com CD é uma alternativa de grande relevância no desenvolvimento e na melhoria de formulações farmacêuticas para liberação de fármacos. As CDs são capazes de aumentar a solubilidade de um fármaco pouco solúvel, acarretando no aumento de sua biodisponibilidade, de aumentar a sua estabilidade, bem como reduzir efeitos colaterais do fármaco após a inclusão (DEL VALLE, 2004; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007).

No processo de formação de um composto de inclusão ocorre, primeiramente, a saída das moléculas de água do interior da cavidade da CD e em seguida a inclusão, total ou parcial, da molécula hóspede no interior dessa cavidade. Tal processo ocorre com facilidade pois a presença de moléculas de água no interior hidrofóbico da cavidade de uma CD é energeticamente desfavorável, portanto, estas podem ser prontamente substituídas por moléculas com maior afinidade. Em solução, as moléculas livres sem encontram em equilíbrio dinâmico com os compostos formados, ressaltando a possibilidade da existência de mais de um tipo de equilíbrio em solução (SZEJTLI, 1998; LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004).

Os compostos de inclusão com CDs melhoram características de liberação sem interferir na atividade do medicamento, por ser um processo reversível. Após ser incluído, ou parcialmente incluído, na cavidade da CD, o fármaco pode ser liberado no organismo a partir de um processo de deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas e que possuam maior afinidade com a cavidade da CD (Figura 1.3). Em formulações com administração por via oral, as CDs protegem o fármaco durante o seu transporte no trato gastrointestinal, local em que o mesmo será absorvido, podendo diminuir efeitos colaterais associados a administração por via oral, e também proporcionar uma maior absorção do fármaco, acarretando no aumentando da biodisponibilidade. As CDs não atravessam a membrana biológica, dessa forma, apenas o fármaco é absorvido e a CD é metabolizada pela flora bacteriana presente no intestino (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE, 1998;

LOFTSSON e MÁSSON, 2001; LOFTSSON, MÁSSON e BREWSTER, 2004; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).



**Figura 1.3** – Representação esquemática da liberação do fármaco, incluído na cavidade no organismo por deslocamento competitivo com substâncias lipofílicas endógenas.

Com isto, torna-se promissora a tentativa de alterar propriedades físico-químicas de fármacos já utilizados no tratamento da doença de Parkinson, através de sistemas do tipo hóspede-hospedeiro, no contexto da Química Supramolecular. Em especial o fármaco antiparkinsoniano supracitado, o qual, como já mencionado, apresenta uma grande quantidade de efeitos colaterais, associados à sua administração por via oral, bem como baixa solubilidade em água e efeito de primeira passagem. Neste contexto, este trabalho objetiva-se na obtenção e caracterização de compostos de inclusão envolvendo o fármaco antiparkinsoniano Cloridrato de Biperideno e as moléculas  $\beta$ -ciclodextrina e Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. A escolha da  $\beta$ CD e da HP $\beta$ CD, como moléculas hóspedes, teve como principal razão a aprovação das mesmas como excipiente, tanto pelo *Food and Drug Administration* (FDA) quanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

## 1.4. Técnicas de caracterização utilizadas

### 1.4.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

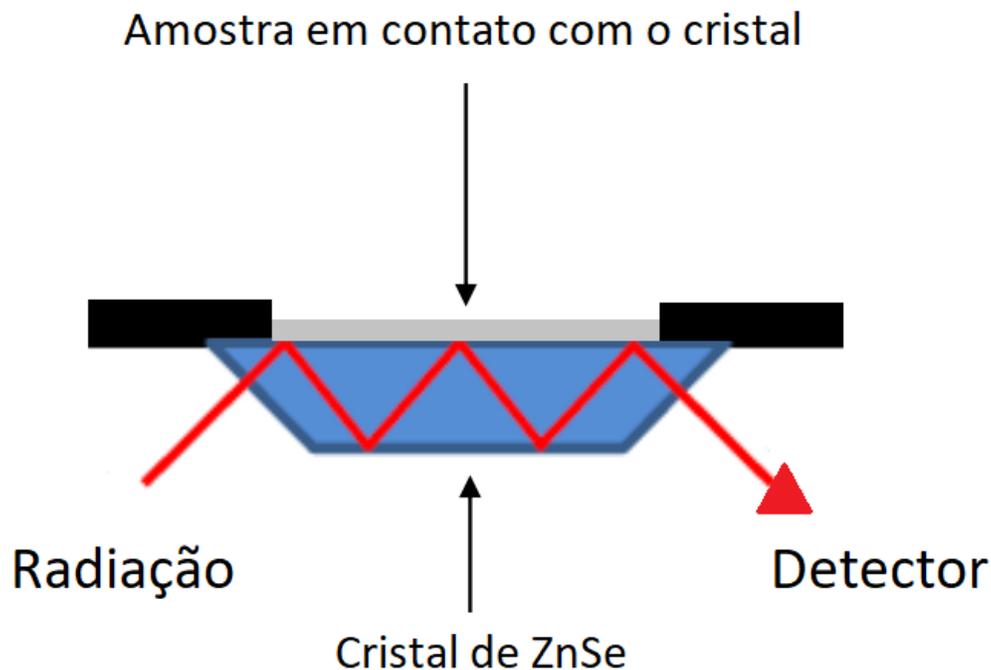
A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma ferramenta versátil para um primeiro momento da caracterização de um composto de inclusão, uma vez que é uma técnica simples, rápida e de baixo custo. Os espectros de infravermelho geralmente são dados em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), e a intensidade das bandas são expressas em transmitância (T). De forma convencional, em um espectro de infravermelho são atribuídas bandas de vibração-rotação que compreende a faixa de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  (PAVIA, LAMPMAN et al., 2010).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações angulares ( $\delta$ ) e estiramentos ( $\nu$ ), sendo o último simétricos ou assimétricos. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas de ligações sem que as posições relativas dos átomos se alterem, logo, elas envolvem alterações dos ângulos de ligação. Já as vibrações de estiramento têm-se um movimento rítmico ao longo de um eixo da ligação, o que faz com que a distância interatômica aumente ou diminua. Quando esse fenômeno ocorre simultaneamente têm-se um estiramento simétrico, enquanto que quando ocorre de forma alternada têm-se um estiramento assimétrico. Em geral, as vibrações de estiramento ocorrem em frequências mais elevadas do que as vibrações de deformação angular, assim, no espectro de infravermelho, os estiramentos aparecem em maior energia enquanto que as deformações angulares aparecem em menor energia (PAVIA et al., 2010).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é amplamente utilizada no estudo de compostos de inclusão no estado sólido (PASSOS, et al., 2012; DE PAULA et al., 2013; MEIRA et al., 2018). Esta técnica espectroscópica é útil para identificar quais modos vibracionais do fármaco e da CD estão sendo perturbados pelo processo de inclusão, sugerindo possíveis interações entre essas moléculas (MURA, 2015).

A Reflectância Total Atenuada (ATR) é um acessório do FTIR, e os espectros resultantes são de alta resolução e reprodutíveis. Utilizando o acessório ATR, a amostra sólida é posicionada em contato com o cristal sendo pressionada com um pistão de diamante, e a radiação infravermelha, produzida e direcionada pelo equipamento, passa através do cristal em direção a amostra sendo refletida em sua superfície interna. Nesse processo ocorre múltiplas reflexões ao

longo de todo o comprimento da amostra até que chegue ao detector (Figura 1.4). Adicionalmente, tal acessório apresenta rápida amostragem, uma vez que a amostra não precisa ser preparada e sim inserida diretamente no cristal, e a amostra não é destruída no processo, o que é muito vantajoso quando se trabalha com quantidades limitadas de amostra (GRDADOLNIK, 2002; MURA, 2015).



**Figura 1.4** – Esquema da trajetória da radiação no acessório ATR.

É importante destacar que esta é uma técnica que fornece indícios sobre a inclusão da molécula hóspede na cavidade da ciclodextrina, ou seja, ela não comprova a inclusão. Tais indícios se dão por alterações, de forma mais ou menos intensa, nos modos vibracionais das moléculas livres quando comparados com os espectros dos compostos de inclusão. As alterações dos modos vibracionais são observadas com o desaparecimento, alargamento, deslocamento e/ou variação na intensidade das bandas presentes (MURA, 2015).

#### **1.4.2. Diagrama de solubilidade de fase**

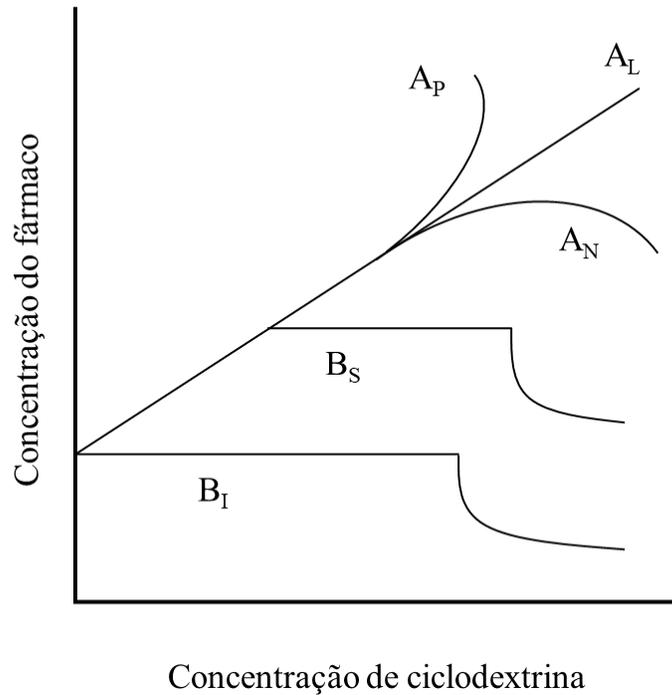
O diagrama de solubilidade de fase é uma das abordagens mais utilizadas como primeira verificação no estudo de compostos de inclusão em solução. Esse método foi descrito por Higuchi e Connors (1965), e tem como finalidade analisar os efeitos de um agente solubilizante, como as

ciclodextrinas, sob a solubilidade de um substrato, permitindo estimar valores das constantes de equilíbrio (K) bem como a estequiometria dos compostos de inclusão formados (HIGUCHI e CONNORS, 1965; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).

Experimentalmente, um excesso do substrato (molécula hóspede) é adicionado em frascos contendo soluções aquosas de diferentes concentrações do agente solubilizante (molécula hospedeira), mantendo a mistura formada em banho à temperatura constante até que o equilíbrio seja estabelecido. Posteriormente, a solução é filtrada e sobrenadante reservado para a determinação da concentração final do substrato, aplicando técnicas analíticas adequadas. Por fim, é possível construir o diagrama de solubilidade de fase para o sistema em estudo, plotando os valores de concentração do substrato solubilizado em função das concentrações do agente solubilizante (HIGUCHI e CONNORS, 1965; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).

A partir desse experimento é possível estabelecer o perfil de solubilidade para o composto de inclusão, e avaliar o efeito da ciclodextrina sob a solubilidade de um determinado fármaco. Os diagramas podem apresentar dois perfis diferentes, sendo denominados tipo A e tipo B, e esses são divididos em subtipos  $A_L$ ,  $A_P$ ,  $A_N$ ,  $B_I$  e  $B_S$ , conforme ilustrado na Figura 1.5 (HIGUCHI e CONNORS, 1965; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).

Diagramas com o perfil do tipo A indicam sistemas onde ocorre a formação de compostos de inclusão solúveis em água. O perfil  $A_L$  apresenta uma relação linear entre as concentrações de ciclodextrina e fármaco, ou seja, a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração de ciclodextrina. Já os perfis  $A_P$  e  $A_N$  apresentam pequenos desvios positivos e negativos respectivamente, assim, o perfil  $A_P$  indica que a ciclodextrina é proporcionalmente mais eficaz em altas concentrações do fármaco, enquanto que o perfil  $A_N$  indica menor eficácia. Por outro lado, diagramas com o perfil do tipo B indicam a formação de composto de inclusão pouco solúveis em água. O perfil  $B_S$  indica a formação um composto com solubilidade limitada, e o perfil  $B_I$  indica a formação de um composto insolúvel. (HIGUCHI e CONNORS, 1965; DEL VALLE, 2004; DAVIS e BREWSTER, 2004; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).



**Figura 1.5** – Tipos de perfis dos diagramas de solubilidade de fase.

Perfis do tipo  $A_L$  são de primeira ordem em relação a CD, sendo mais frequente razões estequiométricas de 1:1 (CD:Fármaco). No entanto, no processo de inclusão, razões estequiométricas de 2:1, 1:2, ou ainda associações de ordem superior podem existir no equilíbrio, muitas vezes de forma simultânea (DAVIS e BREWSTER, 2004; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).

A partir do valor do coeficiente estequiométrico ( $m$ ) é possível calcular a constante de equilíbrio ( $K$ ) mediante a equação de Higuchi e Connors descrita abaixo, onde  $m$  é o coeficiente estequiométrico,  $S_0$  o coeficiente linear e  $K$  é a constante de equilíbrio (HIGUCHI e CONNORS, 1965; DEL VALLE, 204; DENADAI, 2006).

$$\text{declive} = \frac{m.K.S_0^m}{1+K.S_0^m} \quad (\text{Equação 1.1})$$

Se o valor de  $m$  é conhecido pode-se determinar o valor da constante de equilíbrio ( $K$ ):

$$K = \frac{declive}{(S_0)^{m \cdot (m - declive)}} \quad (\text{Equação 1.2})$$

Para estequiometria do composto de inclusão 1:1, com  $m = 1$  tem-se que:

$$K = \frac{declive}{S_0 \cdot (1 - declive)} \quad (\text{Equação 1.3})$$

Os parâmetros termodinâmicos dos sistemas formados, tais como variações padrão de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ), e entropia ( $T\Delta S^\circ$ ), podem ser determinados a partir dos valores de  $K$ . Desta forma, a variação de energia livre de Gibbs pode ser determinada em função da constante de equilíbrio ( $K$ ) obtida e da temperatura medida em Kelvin ( $T$ ), conforme a Equação 1.4, sendo  $R$  a constante universal dos gases (DEL VALLE, 2004; DENADAI, 2006, KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (\text{Equação 1.4})$$

A variação de entalpia pode ser determinada utilizando-se a equação de Van-Hoff (Equação 1.5) e o termo entrópico conforme descrito na Equação 1.6 (DEL VALLE, 2004; DENADAI, 2006, KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

$$\frac{\Delta H^\circ}{R} = \frac{\partial(\ln K)}{\partial(1/T)} \quad (\text{Equação 1.5})$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{Equação 1.6})$$

### 1.4.3. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível

A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica simples e de baixo custo operacional, útil para quantificação de fármacos. Logo, ela é uma

das técnicas analíticas mais aplicadas para a determinação da concentração final do substrato em estudos de solubilidade como o diagrama de solubilidade de fase (DE PAULA et al., 2011; GONTIJO et al., 2014; PADURARU et al., 2013).

Essa técnica baseia-se em medidas de absorção da radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta e do visível correspondes a faixa de comprimento de onda de 190 – 780 nm. Moléculas que apresentam elétrons passíveis de serem promovidos a níveis de energia mais elevados, quando submetidas a radiação, são detectáveis nessa faixa de comprimento de onda. Experimentalmente, uma fonte de radiação é inserida sobre a solução contendo o analito e o equipamento detecta o quanto da radiação foi absorvida pela amostra, fornecendo informações analíticas necessárias para que se possa realizar os cálculos e determinar a concentração desconhecida do analito, a partir da equação da reta obtida por uma curva de calibração (PAVIA et al., 2010; MURA, 2014).

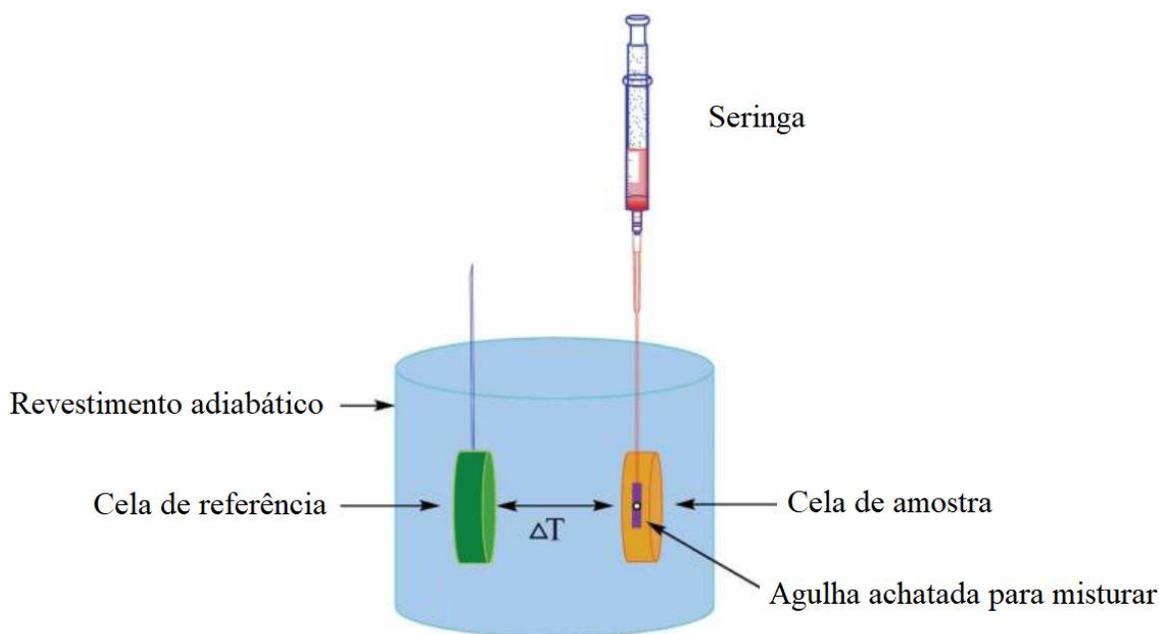
A curva de calibração precisa ser construída a partir de soluções padrão do analito e a mesma relaciona concentrações conhecidas e os valores de absorbância detectados por UV-VIS. Para a validação dessa curva, a mesma precisa ser construída com no mínimo 5 níveis de concentração padrão, sendo necessário o preparo de três réplicas independentes, e coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) próximo de 1. A partir da equação da reta obtida pela curva de calibração e os valores de absorbância máxima, no comprimento de onda de interesse da amostra analisada, é possível determinar a concentração do analito (PAVIA et al., 2010; ANVISA, 2017).

#### **1.4.4. Calorimetria de titulação isotérmica**

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma das técnicas mais importantes no estudo de interações intermoleculares, sendo amplamente aplicada para sistemas supramoleculares, especialmente na caracterização termodinâmica de compostos de inclusão em solução (DENADAI, et al., 2007; DE SOUSA et al., 2008; PASSOS et al., 2011; DE PAULA et al., 2012; MORAIS, et al., 2016; MEIRA et al., 2018). Esta técnica permite obter, de forma direta e em um único experimento, a constante de associação ( $K_a$ ) e os parâmetros termodinâmicos da interação entre a molécula hóspede e a hospedeira, tais como variações padrões de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e o termo entrópico ( $T\Delta S^\circ$ ). Adicionalmente, também é possível

determinar a estequiometria do sistema formado (TURNBULL e DARANAS, 2003; BOUCHEMAL, 2008; BASTOS e VELAZQUEZ-CAMPOY, 2021).

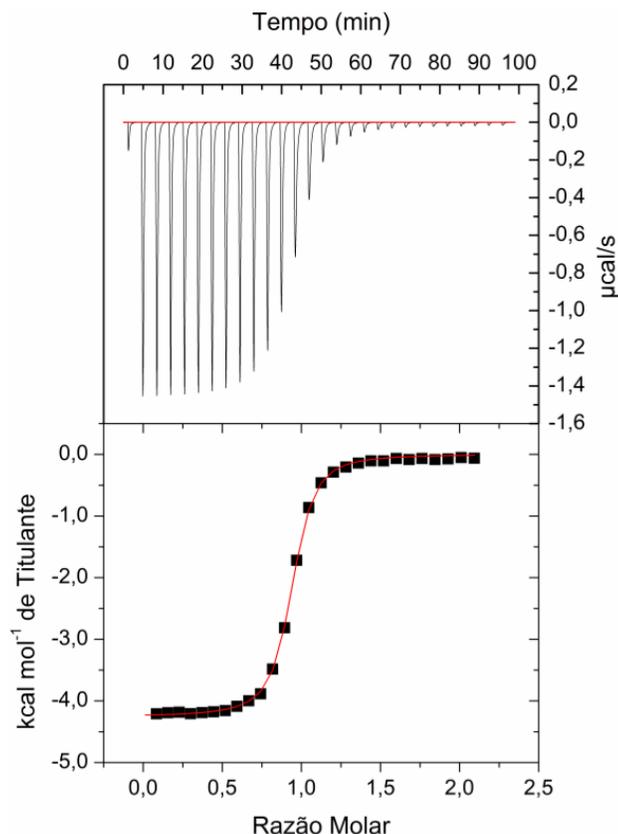
O equipamento utilizado é um calorímetro de titulação isotérmica e a sua representação esquemática pode ser observada na Figura 1.6. Este equipamento é composto por duas celas, sendo uma de referência, a qual contém o solvente utilizado no preparo das soluções de titulante e titulado, e a outra é a cela de titulação da amostra, onde a solução de titulado é inserida e a seringa carregada com a solução de titulante é injetada. Durante o processo de titulação por ITC, ocorre uma troca de energia térmica entre as celas de referência e de amostra, resultante da quebra e formação de interações entre as espécies, uma vez que o calorímetro é adiabático, não havendo trocas de calor com o meio externo, mas as celas são isotérmicas (FREIRE, MAYORGA e STRAUME, 1990; FREIRE, 2004; BASTOS e VELAZQUEZ-CAMPOY, 2021).



**Figura 1.6** – Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica (Figura adaptada de SONG, ZHANG e HUANG, 2015).

No estudo termodinâmico de compostos de inclusão utilizando a titulação por ITC, a interação entre a molécula hóspede e a molécula hospedeira vai ocorrer durante as injeções de quantidades pré-determinadas de titulante na cela contendo o titulado. Cada injeção ocorre em intervalos de tempo controlados e a uma temperatura constante, gerando um sinal de diferença de

temperatura distinto, sendo este integrado para a formação de uma isoterma. No geral, para sistemas que apresentam forte interação e valores relativamente altos para a constante de associação, o perfil da curva de titulação tende a ser uma sigmoide (Figura 1.7) (FREIRE, MAYORGA e STRAUME, 1990; FREIRE, 2004; BOUCHEMAL, 2008).



**Figura 1.7** – Resultado obtido para a titulação de  $\text{CaCl}_2$   $1,00 \text{ mmol.L}^{-1}$  em EDTA  $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Para determinar os parâmetros termodinâmicos a partir dos dados do equipamento é preciso utilizar um modelo de regressão não-linear no ajuste das curvas e o modelo matemático comumente utilizado para esse processo é a isoterma de Wiseman. Assim, a partir destes ajustes é possível determinar simultaneamente a estequiometria ( $n$ ),  $K_a$  e  $\Delta H^\circ$  do sistema. Adicionalmente, utilizando estes dados é possível calcular os valores de  $\Delta G^\circ$  e  $T\Delta S^\circ$  mediante as equações matemáticas 1.4 e 1.6 descritas anteriormente (WISEMAN et al., 1989; TURNBULL e DARANAS, 2003; BOUCHEMAL, 2008).

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar compostos de inclusão entre as moléculas  $\beta$ -Ciclodextrina e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina e o fármaco Cloridrato de Biperideno pertencente à classe dos Antiparkinsonianos.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Preparar compostos de inclusão envolvendo o fármaco BPR como molécula hóspede e as moléculas  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD como moléculas hospedeiras, utilizando o método de liofilização;
- Caracterizar os possíveis compostos de inclusão formados entre o fármaco BPR e as moléculas  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, utilizando as técnicas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, calorimetria de titulação isotérmica e ressonância magnética nuclear;
- Estudar o efeito da  $\beta$ CD e da HP $\beta$ CD sob a solubilidade do fármaco BPR;
- Estudar o comportamento termodinâmico da interação entre o fármaco BPR e as moléculas  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD.

# **CAPÍTULO 2**

## **METODOLOGIA**

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho as análises de espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível, espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho e calorimetria de titulação isotérmica, foram realizadas na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Os experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensionais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e bidimensionais *Heteronuclear Single Quantum Correlation* - HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), *Heteronuclear multiple bond correlation* - HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), *correlation spectroscopy* – COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), *Total Correlation Spectroscopy* – TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) e *Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* – ROESY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), foram realizados em colaboração com a Dra. Ivana Silva Lula no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 2.1. Materiais e Reagentes

Durante os experimentos foram utilizados água tipo I (Milli-Q<sup>®</sup>), água deuterado (Cambridge Isotope Laboratories) e clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solventes. Já os reagentes utilizados nos estudos de solubilidade, e no preparo e caracterização dos compostos de inclusão, bem como suas propriedades físico-químicas encontram-se listados abaixo.

$\beta$ -ciclodextrina

Código:  $\beta\text{CD}$ .

Fórmula molecular:  $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ .

Massa molecular:  $1135 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$ :  $18,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Característica: Sólido branco cristalino.

Fabricante: Sigma-Aldrich.

HP- $\beta$ -ciclodextrina

Código: HP $\beta\text{CD}$

Fórmula molecular:  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{ClNO} \cdot n\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$

Massa molecular: 1400 g.mol<sup>-1</sup>.

Solubilidade em água a 25°C: > 600 g.L<sup>-1</sup>.

Característica: Sólido branco cristalino.

Fabricante: Sigma-Aldrich.

### Cloridrato de Biperideno

Código: BPR.

Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>ClNO.

Massa molecular: 347,9 g.mol<sup>-1</sup>.

Solubilidade em água a 25°C: 4,3 g.L<sup>-1</sup>.

Característica: Sólido branco cristalino.

Fabricante: Droga Raia.

## 2.2. Descrição dos experimentos

### 2.2.1. Preparo dos compostos de inclusão

Os compostos de inclusão, envolvendo a molécula hóspede e as moléculas hospedeiras, foram preparados utilizando o método de liofilização. O referido método consiste na solubilização da molécula hóspede (BPR) e da molécula hospedeira ( $\beta$ CD ou HP $\beta$ CD) em água. Desta forma, as soluções são unidas e o sistema é mantido sob agitação até que o sistema entre em equilíbrio dinâmico. Após o período de agitação, a solução é congelada imediatamente e submetida ao processo de liofilização, até a obtenção de um sólido (DEL VALLE, 2004; DE SOUSA et al., 2008; PASSOS et al, 2011; DE PAULA et al., 2013; MOURA et al, 2016; MEIRA et al., 2018).

Foram preparados compostos de inclusão na razão molar de 1:1 ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR). Para o preparo do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR adicionou-se 30,65 mg de BPR (88,1  $\mu$ mol), solubilizados em 12,0 mL de água, em um béquer de 25,0 mL contendo uma solução aquosa com 100,00 mg de  $\beta$ CD (88,1  $\mu$ mol). O sistema foi mantido sob agitação magnética, por 4 horas, em temperatura ambiente, com o intuito de garantir que o sistema atingisse o equilíbrio. Após o período de agitação, a solução foi congelada em um banho de gelo nas proporções de 500,0 g de gelo, 200,0 mL de água, 50,0 g de NaCl e 50,0 mL de álcool 99 %. Na sequência, o composto

foi submetido ao processo de liofilização, utilizando um liofilizador JJ Científica do modelo LJJ104, por cerca de 48 horas a  $-51^{\circ}\text{C}$  (DE SOUSA et al., 2008; PASSOS et al., 2011). Para o preparo do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR, repetiu-se o experimento descrito acima adicionando-se 24,85 mg de BPR (71,4  $\mu\text{mol}$ ), solubilizados em 12,0 mL de água, em um béquer de 25,0 mL contendo uma solução aquosa com 100,00 mg de HP $\beta$ CD (71,4  $\mu\text{mol}$ ).

Adicionalmente, misturas mecânicas foram preparadas mediante a mistura direta do fármaco BPR com cada molécula hospedeira,  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, por aproximadamente 20 minutos, utilizando um equipamento Vortex IKA MS3. As misturas mecânicas foram denominadas MM( $\beta$ CD:BPR) e MM(HP $\beta$ CD:BPR) e preparadas na razão molar de 1:1 ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR), conforme os compostos de inclusão preparados por liofilização. O preparo de tais misturas mecânicas tem como objetivo uma futura comparação com os compostos de inclusão no estado sólido preparados por liofilização.

## **2.3. Caracterizações**

### **2.3.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Spectrum 100 (Perkin Elmer®) utilizando acessório de reflectância total atenuada com transformada de Fourier (FTIR-ATR), na região compreendida entre  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos com 64 varreduras por amostra e uma resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Foram obtidos espectros dos compostos de inclusão  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, das suas respectivas misturas mecânicas MM( $\beta$ CD:BPR) e MM(HP $\beta$ CD:BPR), e dos compostos livres  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e BPR.

### **2.3.2. Estudo de solubilidade**

Estudos de solubilidade foram realizados para os sistemas envolvendo as moléculas hospedeiras,  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, e a molécula hóspede BPR em água ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR), por meio do método proposto por Higuchi e Connors (HIGUCHI e CONNORS, 1965). O referido método relaciona o efeito de um agente solubilizante, como as ciclodextrinas, sob a solubilidade do fármaco (HIGUCHI e CONNORS, 1965; DENADAI, et al., 2004; BREWSTER e LOFTSSON,

2007; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014). Para o sistema  $\beta$ CD:BPR o experimento foi realizado adicionando-se um excesso de Cloridrato de Biperideno (7,0 mg de BPR) a soluções aquosas com diferentes concentrações de  $\beta$ CD, conforme descrito na Tabela 2.1. Foram preparadas 13 amostras, em triplicata, totalizando 39 amostras, com a concentração de  $\beta$ CD variando de 0,000 a 0,012 mol.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.1** – Esquema de preparo das amostras para a realização do teste de solubilidade de BPR na presença de  $\beta$ CD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.

Amostras (7,0 mg de BPR)	Volumes (mL)		Concentração de $\beta$ CD (mol.L <sup>-1</sup> )
	H <sub>2</sub> O	$\beta$ CD 0,012 mol.L <sup>-1</sup>	
1	1,00	0,00	0,000
2	0,92	0,08	0,001
3	0,83	0,17	0,002
4	0,75	0,25	0,003
5	0,67	0,33	0,004
6	0,58	0,42	0,005
7	0,50	0,50	0,006
8	0,42	0,58	0,007
9	0,33	0,67	0,008
10	0,25	0,75	0,009
11	0,17	0,83	0,010
12	0,08	0,92	0,011
13	0,00	1,00	0,012

A mistura obtida foi mantida em um banho à temperatura constante de 37 °C por 24 horas e em seguida centrifugada até obtenção de um sobrenadante límpido. Alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). A concentração de BPR em cada solução foi determinada em 258 nm, com referência a uma curva de calibração apropriada, por um espectrofotômetro Varian do modelo Cary 50 Scan,

com varredura na faixa de 200 a 800 nm, usando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O experimento foi repetido para as temperaturas de 47 e 57 °C.

Repetiu-se o experimento descrito acima para o sistema HP $\beta$ CD:BPR, adicionando-se um excesso de Cloridrato de Biperideno (9,0 mg de BPR) a soluções aquosas com diferentes concentrações de HP $\beta$ CD, conforme descrito na Tabela 2.2. Foram preparadas 16 amostras, em triplicata, totalizando 48 amostras, com a concentração de HP $\beta$ CD variando de 0,000 a 0,040 mol.L<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.2** – Esquema de preparo das amostras para a realização do teste de solubilidade de BPR na presença de HP $\beta$ CD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.

Amostras (9,0 mg de BPR)	Volumes (mL)			Concentração final de HP $\beta$ CD (mol.L <sup>-1</sup> )
	H <sub>2</sub> O	HP $\beta$ CD	[HP $\beta$ CD] (mol.L <sup>-1</sup> )	
1	1,00	0,00	0,012	0,000
2	0,92	0,08	0,012	0,001
3	0,83	0,17	0,012	0,002
4	0,75	0,25	0,012	0,003
5	0,67	0,33	0,012	0,004
6	0,58	0,42	0,012	0,005
7	0,50	0,50	0,012	0,006
8	0,42	0,58	0,012	0,007
9	0,33	0,67	0,012	0,008
10	0,25	0,75	0,012	0,009
11	0,17	0,83	0,012	0,010
12	0,08	0,92	0,012	0,011
13	0,00	1,00	0,012	0,012
14	0,00	1,00	0,020	0,020
15	0,00	1,00	0,030	0,030
16	0,00	1,00	0,040	0,040

Posteriormente, para a determinação das concentrações de BPR nas soluções, foi construída uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de BPR. Para a construção da curva, preparou-se uma solução de concentração conhecida de BPR ( $5,81 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) sendo realizadas diluições da mesma para a obtenção de 10 pontos na curva. As soluções utilizadas para a construção da curva de calibração foram preparadas em triplicata e alíquotas foram analisadas por espectrofotometria de absorção na região do UV-VIS. A curva de calibração final foi determinada a partir da média aritmética das três curvas obtidas.

Por fim, foi construído o diagrama de solubilidade de fase para os sistemas  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, determinando-se os dados termodinâmicos conforme descrito no capítulo 1, seção 1.4.2.

### **2.3.3. Calorimetria de titulação isotérmica**

Para a construção das curvas de titulação, foi necessário realizar ajustes nas concentrações das soluções de titulante e titulado para cada sistema em estudo, até a obtenção de curvas que se ajustassem ao perfil sigmoide ou aquele no qual não é mais observada variação de entalpia, podendo estas curvas serem ajustadas ao modelo matemático aplicado. Após estas titulações, foram preparadas soluções de BPR  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ , de  $\beta$ CD  $14,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  e de HP $\beta$ CD  $60 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Todas as soluções foram preparadas utilizando água tipo I como solvente (Milli-Q®).

As titulações calorimétricas foram realizadas em duplicata em microcalorímetro VP-ITC (Microcal®) com 25 pontos cada e espaçamento de 300 segundos entre cada um deles, nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C. A primeira injeção de cada titulação foi de 1  $\mu\text{L}$  e esse primeiro ponto foi descartado com o intuito de eliminar os efeitos de dispersão, e as demais injeções de 10  $\mu\text{L}$  foram utilizadas para construir a curva de titulação. Os experimentos foram realizados utilizando solução aquosa do fármaco BPR  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  como titulado e soluções aquosas de  $\beta$ CD  $14,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  e HP $\beta$ CD  $60,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  como titulantes. Adicionalmente, para subtrair os efeitos da interação entre os compostos e o solvente, foram realizadas titulações entre cada titulante e água tipo I bem como água tipo I e o titulado.

Os gráficos obtidos foram analisados pelo software ORIGIN 7.0 para ITC, que utiliza o modelo de regressão não linear no ajuste das curvas, aplicando a isoterma de Wiseman. Assim, os valores do coeficiente estequiométrico (n), da constante de associação ( $K_a$ ) e da variação de

entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) foram obtidos. A partir desses resultados foi possível determinar a variação de energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ) e a contribuição entrópica ( $T\Delta S^\circ$ ), conforme as equações descritas no capítulo 1, seção 1.4.2.

#### **2.3.4. Ressonância magnética nuclear**

Os compostos de inclusão preparados por liofilização na razão molar de 1:1 e do BPR livre foram caracterizados pela técnica de RMN utilizando experimentos uni- e bidimensionais. Para o fármaco livre (BPR) foram a combinação dos experimentos para a atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênio da molécula. Para isso, o BPR na concentração de 5,0 mg em 0,7 mL de  $\text{CDCl}_3$  foi utilizado. Para os compostos de inclusão na razão molar de 1:1 (CD/BPR) foram utilizadas a massa de 10,0 mg em cada caso em 0,7 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ . A diferença na utilização de  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{D}_2\text{O}$ , foi necessária devido a baixa solubilidade do BPR em água e a não utilização de solventes que possam competir com a cavidade da CD no caso dos compostos de inclusão. Todos os experimentos foram realizados em equipamento Bruker AVANCE NEO 600 MHz.

**CAPÍTULO 3**  
**RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Liofilização dos compostos de inclusão

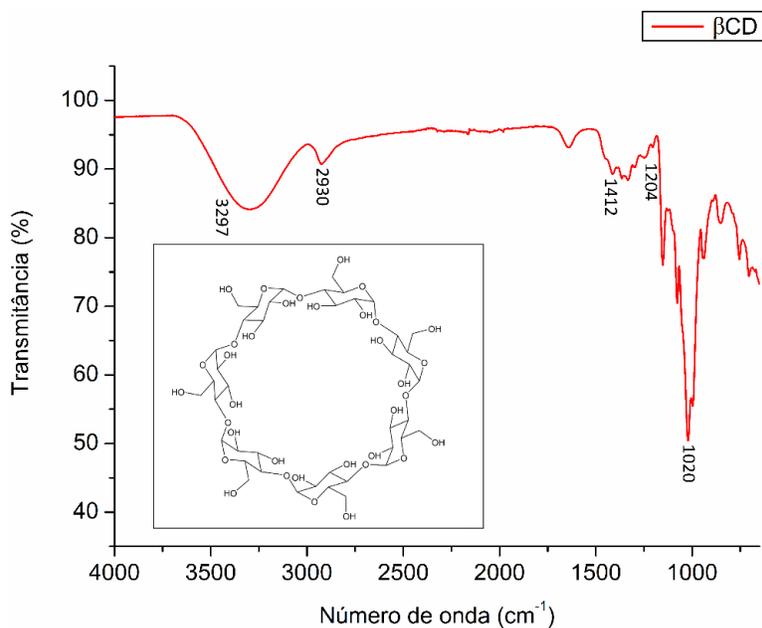
A técnica de liofilização é um dos métodos mais utilizados para a formação de compostos de inclusão em estado sólido, tendo-se diversos estudos publicados na literatura nos últimos anos (DE SOUSA et al. 2008; DE PAULA et al., 2012; PASSOS et al., 2012; MORAIS et al., 2016; MEIRA et al, 2018). Tal método constitui na remoção do solvente da solução congelada dos compostos preparados, por meio de sublimação. Assim, o método de liofilização foi utilizado para o preparo dos compostos de inclusão no estado sólido para os sistemas envolvendo as moléculas hóspedes,  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, e o fármaco BPR ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR). Os compostos obtidos no estado sólido apresentaram aspecto de algodão na coloração branca, sendo está uma característica esperada.

### 3.2. Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

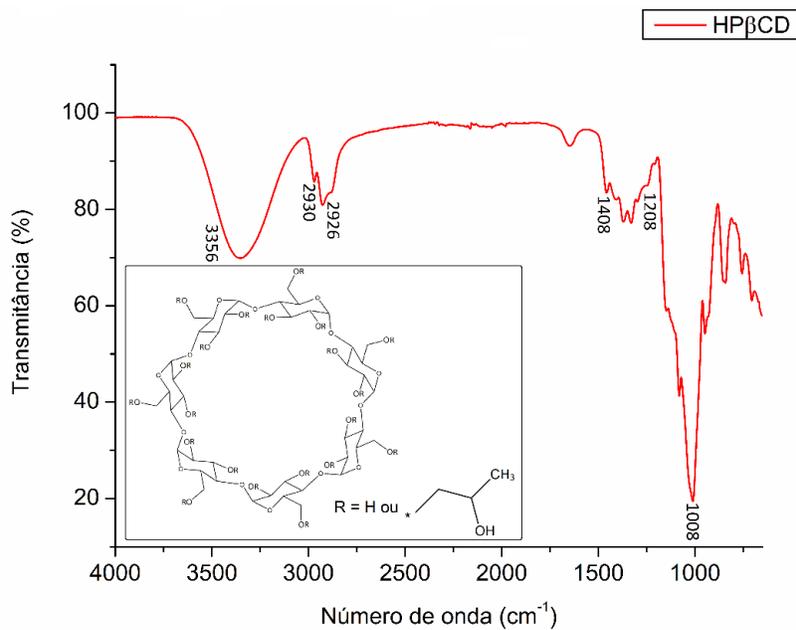
Os compostos de inclusão preparados pelo método de liofilização foram analisados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, utilizando o acessório ATR – *Attenuated total reflectance* (FTIR-ATR) para avaliar possíveis modificações nos modos vibracionais em relação aos espectros das moléculas precursoras, uma vez que tal acessório apresenta rápida amostragem e a amostra analisada não é destruída no processo (MURA, 2015).

Os espectros de absorção na região do infravermelho obtidos por FTIR-ATR para as moléculas hospedeiras livres,  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD, estão apresentados nas Figuras 3.1 e 3.2 respectivamente. Como a HP $\beta$ CD é uma  $\beta$ CD modificada pela substituição do hidrogênio das hidroxilas do C2 por um grupo hidroxipropil, ambos espectros são semelhantes. O espectro da HP $\beta$ CD tem como diferença apenas a presença de mais bandas que foram atribuídas ao  $\nu$  (C-H), devido ao grupo hidroxipropil. Os principais modos vibracionais foram atribuídos a partir da análise dos espectros para a  $\beta$ CD e para a HP $\beta$ CD e estão relacionados na Tabela 3.1. As atribuições dos principais modos vibracionais para as CDs estão de acordo com os dados prévios

publicados na literatura (EGYED, 1990; DE PAULA et al. 2012; PADURARU et al., 2013; MEIRA et al. 2018).



**Figura 3.1** – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para a βCD.

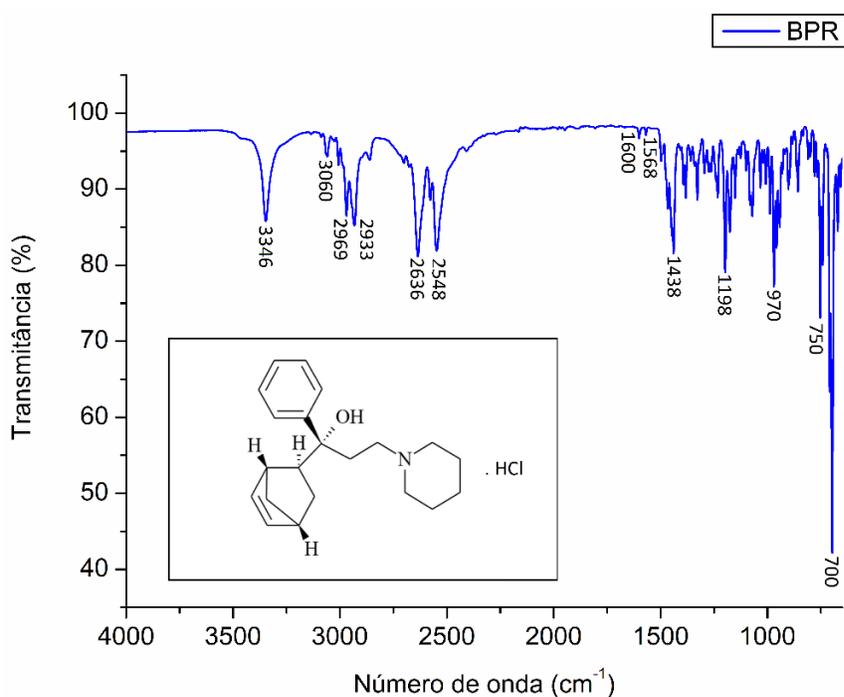


**Figura 3.2** – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para a HPβCD.

**Tabela 3.1** – Atribuição das principais bandas dos espectros de absorção na região do infravermelho para as moléculas  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD.

Ciclodextrinas	Regiões (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
$\beta$ CD	3297	$\nu$ (O-H)
HP $\beta$ CD	3356	
$\beta$ CD	2930	$\nu$ (C-H)
HP $\beta$ CD	2970 e 2926	
$\beta$ CD	1412 – 1204	$\delta$ (C-H)
HP $\beta$ CD	1408 – 1208	
Bcd	1020	$\nu$ (C-O-C)
HP $\beta$ CD	1008	

Já o espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para o fármaco BPR pode ser observado na Figura 3.3 e as atribuições dos principais modos vibracionais encontram-se descritas na Tabela 3.2.



**Figura 3.3** – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para o fármaco BPR.

**Tabela 3.2** – Atribuição das principais bandas do espectro de absorção na região do infravermelho para o fármaco BPR.

<b>Regiões (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
3346	v (O-H)
3060	v (C-H) de aromático
2969 e 2933	v (C-H) e (C-H <sub>2</sub> ) simétrico e assimétrico
2636 e 2548	v (N-H <sup>+</sup> )
1600 – 1568	Vibrações (C=C) de aromático
1438	v (C=C) de aromático
1198	v (C-N)
970	δ (C-H) de alceno dissubstituído
750 e 700	δ (C-H) fora do plano de H adjacente

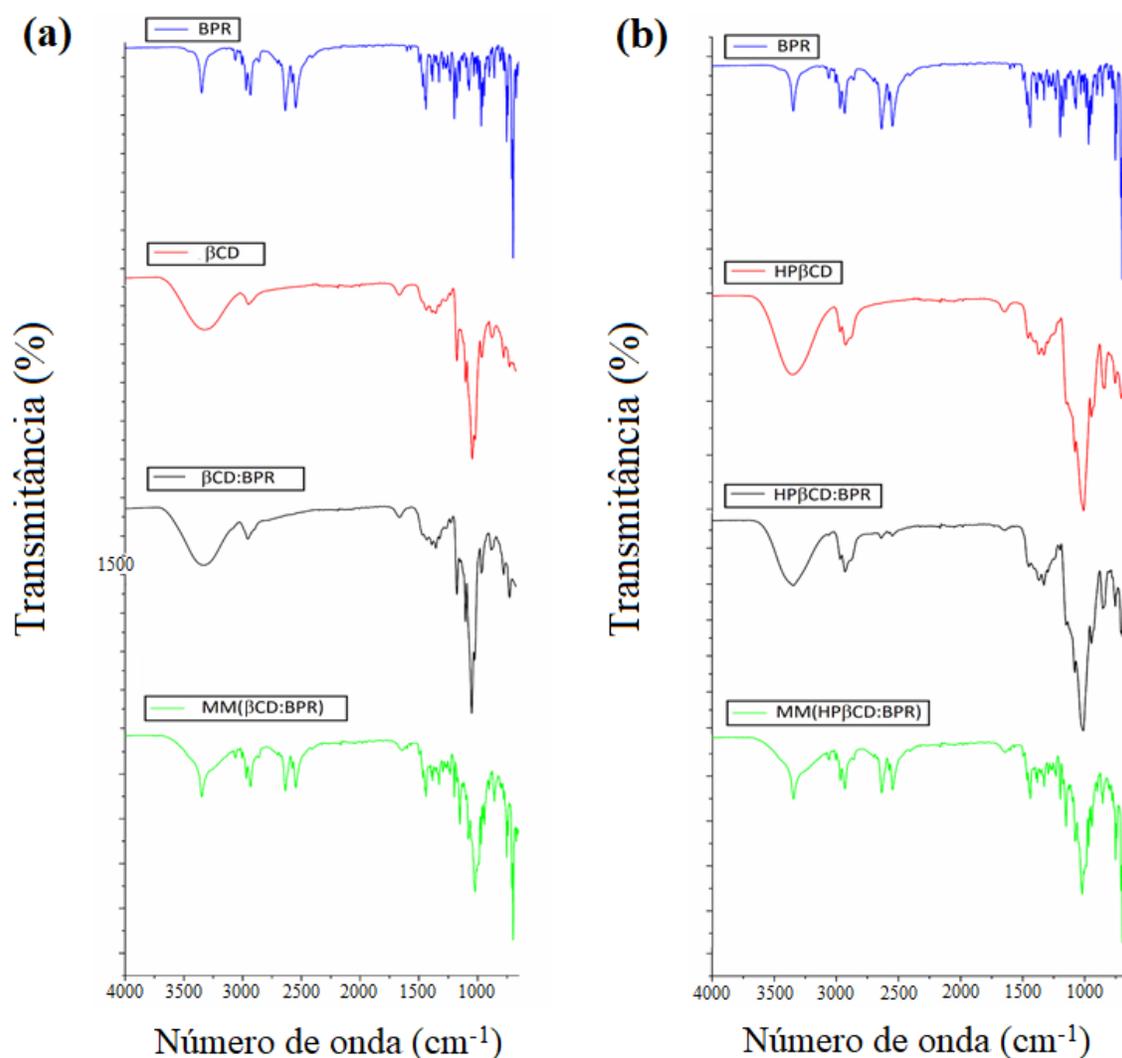
Uma vez caracterizados os principais modos vibracionais de cada uma das moléculas livres, foram realizadas comparações qualitativas entre tais espectros e os referentes aos compostos de inclusão ( $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR) e suas respectivas misturas mecânicas (MM( $\beta$ CD:BPR) e MM(HP $\beta$ CD:BPR)). A comparação entre os espectros é útil para identificar perturbações nos modos vibracionais das moléculas hóspede e hospedeira, podendo serem causadas pelo processo de inclusão, sugerindo possíveis interações entre as moléculas. Entretanto é importante ressaltar que não é possível confirmar a inclusão por FTIR, uma vez que sistemas supramoleculares são baseados em interações intermoleculares fracas e a técnica não é sensível o suficiente para detectar com precisão alterações no sistema (MURA, 2015).

Os espectros de absorção na região do infravermelho para as moléculas livres ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e BPR), juntamente com os espectros para os compostos de inclusão,  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, e suas respectivas misturas mecânicas, MM( $\beta$ CD:BPR) e MM(HP $\beta$ CD:BPR), estão apresentados na Figura 3.4.

Por meio de uma análise comparativa entre os espectros, não foi observado a presença de bandas atribuídas ao fármaco BPR no espectro do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR (Figura 3.4 (a)). Já no espectro do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR, Figura 3.4 (b), tem-se a presença de bandas que foram atribuídas aos modos vibracionais do fármaco BPR. Entretanto as mesmas são observadas com baixa intensidade. Comparando os espectros das CDs livres com os dos compostos

de inclusão não foram observadas alterações significativas nas bandas atribuídas as CDs. Logo, considerando que a técnica de FTIR não é sensível o suficiente para detectar alterações em sistemas supramoleculares, não foi possível determinar a existência de perturbações nos modos vibracionais, desses sistemas, de forma conclusiva.

Dessa forma, verificou-se que, embora a técnica de FTIR tenha sido eficiente para auxiliar na caracterização de diversos compostos de inclusão envolvendo CDs, reportados na literatura, a mesma não foi eficaz para a caracterização dos sistemas em estudo BPR:CD (DE PAULA et al., 2012; PADURARU et al. 2013).



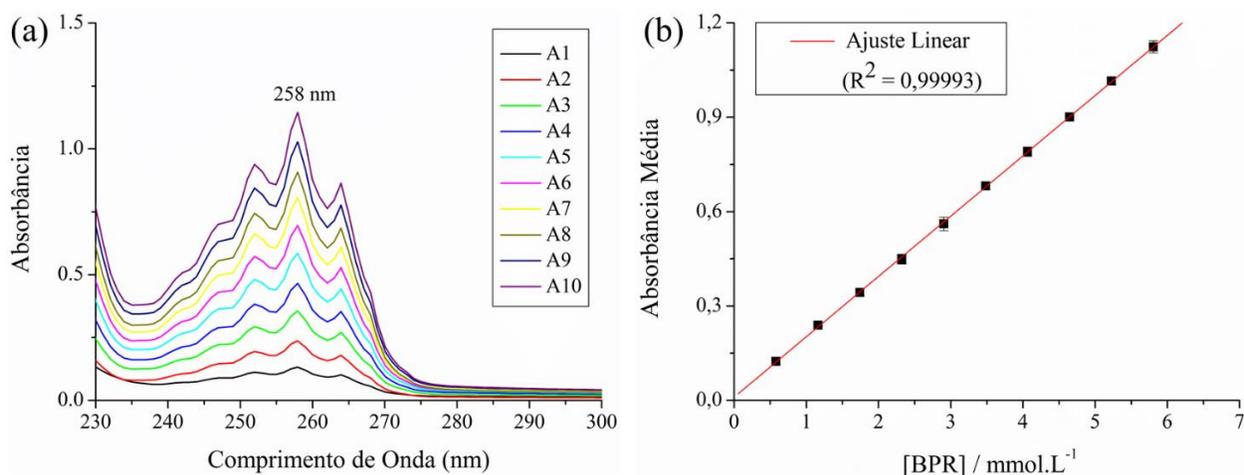
**Figura 3.4** – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido por FTIR-ATR para (a) o BPR, a  $\beta$ CD, o composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR e a MM( $\beta$ CD:BPR); (b) o BPR, a HP $\beta$ CD, o composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR, e a MM(HP $\beta$ CD:BPR).

Analisando os espectros das misturas mecânicas, denominadas MM( $\beta$ CD:BPR) e MM(HP $\beta$ CD:BPR), apresentados na Figura 3.4, é possível observar modos vibracionais atribuídos tanto às CDs quanto ao BPR, sem a ocorrência de alterações como o desaparecimento, alargamento, deslocamento e/ou variação na intensidade das bandas. Logo, os referidos espectros podem ser considerados como uma soma das bandas características das moléculas precursoras, sugerindo que não ocorre interação entre as espécies a partir desse método de preparo.

### 3.3. Estudo de solubilidade

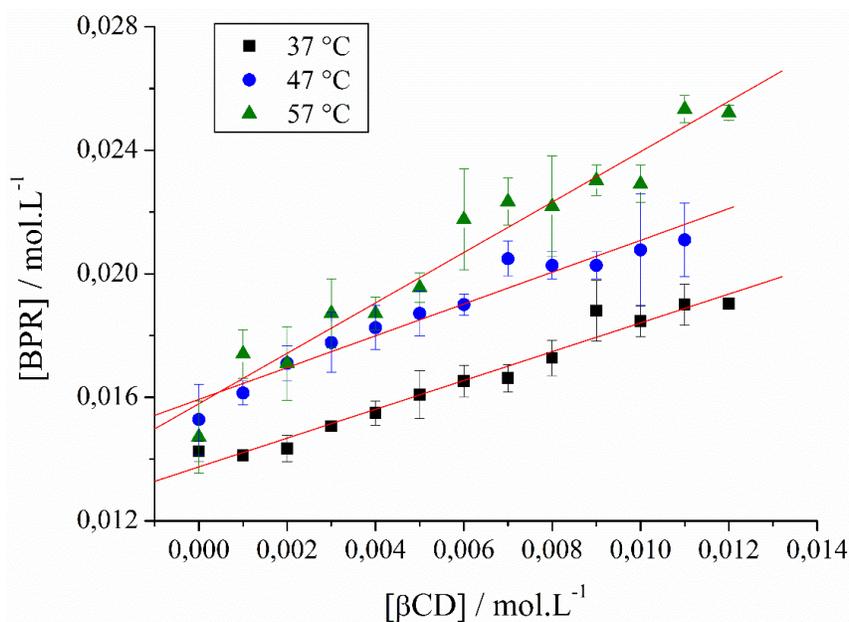
Foram realizados estudos de solubilidade para os sistemas  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, com o intuito de relacionar o efeito das CDs em estudo sob a solubilidade do fármaco BPR, uma vez que uma das propriedades mais relatadas em literatura para compostos de inclusão com CD é o aumento da solubilidade da molécula hospedeira (TONNESEN, MÁSSON e LOFTSSON, 2002; DENADAI et al., 2006; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; PASSOS et al., 2011). Tal efeito pode ser analisado mediante o diagrama de solubilidade de fase proposto por Higuchi e Connors, descrito no Capítulo 1, Sessão 1.4.2 (HIGUCHI e CONNORS, 1965).

Dessa forma, para obtenção do diagrama de solubilidade de fase, para ambos sistemas estudados, as concentrações de BPR foram determinadas mediante os valores de absorvância máxima no comprimento de onda 258 nm ( $Ab_{S_{máx}:258 \text{ nm}}$ ), obtidos por meio das leituras das alíquotas dos sobrenadantes por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível, e a equação da reta obtida pela curva de calibração. Os espectros de absorção na região do UV-Vis do BPR em concentrações crescentes, dos quais os dados obtidos foram utilizados para a construção da curva de calibração, podem ser observados na Figura 3.5 (a). A curva de calibração com o ajuste linear está apresentada na Figura 3.5 (b) e a mesma foi determinada a partir da média de três réplicas, e coeficiente de relação linear próximo de 1 ( $R^2 = 0,99993$ ).

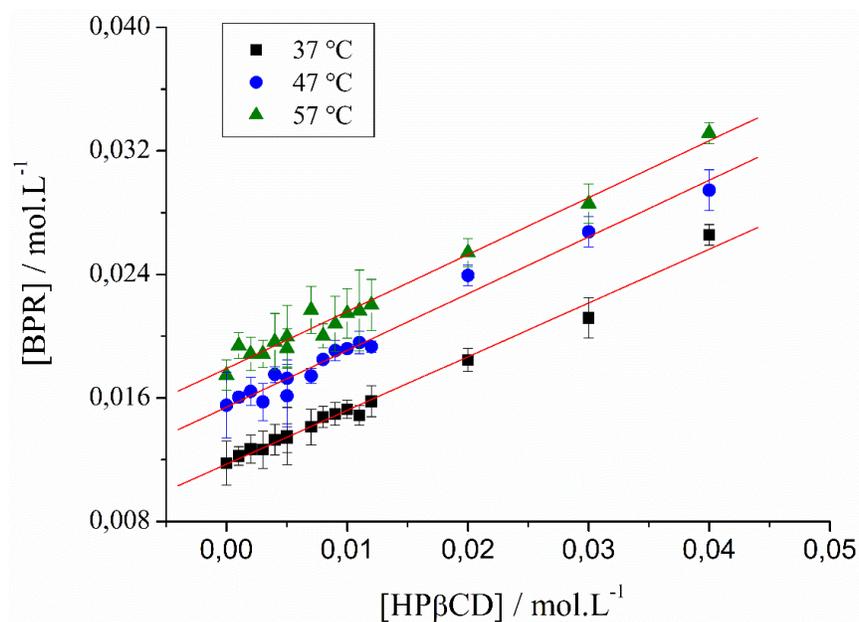


**Figura 3.5** – (a) Espectros de absorção na região do UV-Vis do fármaco BPR nas concentrações variando de 0,5806 (A1) a 5,8062 mmol.L<sup>-1</sup> (A10); (b) Curva de calibração com ajuste linear utilizada para determinar a concentração de BPR nas amostras. Os valores estão expressos com a média e o desvio padrão da média, de três réplicas.

A partir dos dados de concentração de BPR obtidos foi possível estabelecer o diagrama de solubilidade de fase para os sistemas  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C, os quais estão apresentados nas Figuras 3.6 e 3.7, respectivamente.



**Figura 3.6** – Diagrama de solubilidade de fase de BPR na presença de concentrações crescentes de  $\beta$ CD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.



**Figura 3.7** – Diagrama de solubilidade de fase de BPR na presença de concentrações crescentes de HPβCD nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.

Para ambos sistemas foi observado um perfil de solubilidade do tipo  $A_L$ , uma vez que a solubilidade do fármaco aumenta linearmente com o aumento da concentração da CD em cada sistema estudado. Assim, é possível inferir que a solubilidade dos compostos de inclusão é superior à do fármaco BPR livre, mostrando que a inclusão de BPR com a βCD ou HPβCD pode promover um aumento na solubilidade do mesmo (HIGUCHI e CONNORS, 1965). Esse efeito no qual a βCD e a HPβCD promovem o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis é descrito em literatura para outros sistemas supramoleculares (DENADAI et al., 2006; LOFTSSON et al., 2008; PADURARU et al., 2013).

Em um primeiro momento, assumindo estequiometria de 1:1 (CD:BPR), com  $m = 1$ , os valores de  $K_a$  foram calculados para ambos sistemas nas três temperaturas mediante Equação 1.3. A partir dos valores de  $K_a$ , os parâmetros termodinâmicos foram calculados utilizando as Equações 1.4, 1.5 e 1.6. Todas equações citadas estão descritas no Capítulo 1, Sessão 1.4.2 e a Tabela 3.3 mostra os parâmetros termodinâmicos calculados para os sistemas descritos, assumindo estequiometria 1:1.

**Tabela 3.3** – Parâmetros termodinâmicos calculados para os sistemas  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR a 37, 47 e 57 °C.

Sistema $\beta$ CD:BPR	T / °C	M	$K_a$	$\Delta G^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$\Delta H^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$T\Delta S^\circ / \text{KJmol}^{-1}$
	37	1,0	63,6	-10,7	-62,8	-52,1
	47	1,0	66,7	-11,2	-62,8	-51,6
	57	1,0	280,6	-15,5	-62,8	-47,3
Sistema HP $\beta$ CD:BPR	T / °C	M	$K_a$	$\Delta G^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$\Delta H^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$T\Delta S^\circ / \text{KJmol}^{-1}$
	37	1,0	45,6	-9,9	14,9	24,6
	47	1,0	37,7	-9,7	14,9	24,4
	57	1,0	32,6	-9,6	14,9	24,3
	37	2,0	1537,5	-18,9	34,3	53,2
	47	2,0	947,6	-18,2	34,3	52,5
	57	2,0	704,5	-18,0	34,3	52,3

Os maiores valores de  $K_a$  obtidos para o sistema envolvendo a  $\beta$ CD, nas três temperaturas, sugerem que a afinidade entre esta CD e o fármaco BPR é maior quando comparada à HP $\beta$ CD. Contudo, os valores obtidos para os dois sistemas em estudo foram relativamente baixos quando comparados a outros sistemas com CDs descritos em literatura (DENADAI et al., 2006; PADURARU et al., 2013). Mesmo com valores de  $K_a$  pequenos, o processo de formação do composto de inclusão se mostrou espontâneo para ambos os sistemas, dado os valores negativos de  $\Delta G^\circ$ . Analisando os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $T\Delta S^\circ$  foi observado que o processo de formação do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR é favorecido entalpicamente, uma vez que a contribuição entálpica se mostrou maior do que a entrópica. Já o processo de formação do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR é favorecido entropicamente, pois a contribuição entrópica é superior à entálpica.

De forma complementar, as estequiometrias dos sistemas em estudo foram estimadas por calorimetria de titulação isotérmica. Mediante tal técnica o sistema envolvendo a  $\beta$ CD apresentou coeficiente estequiométrico próximo de 1, sendo correspondente a estequiometria de 1:1 ( $\beta$ CD:BPR) estimada na discussão acima. Entretanto, o sistema envolvendo a HP $\beta$ CD apresentou valores fracionados que tendem a valores superiores à 1 com o aumento de temperatura. Logo, adicionalmente, foram calculados o valor de  $K_a$  e os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $T\Delta S^\circ$ ) para o sistema HP $\beta$ CD:BPR, nas três temperaturas, assumindo estequiometria de 2:1 (HP $\beta$ CD:BPR), com  $m = 2$ , conforme as equações citadas acima. Tais resultados estão

apresentados na Tabela 3.3 e uma discussão detalhada referente a técnica de ITC para os sistemas em estudo encontra-se descrita na Sessão 3.4 deste Capítulo.

Analisando os resultados obtidos para o sistema HP $\beta$ CD:BPR (2:1), foi possível observar um aumento nos valores de  $K_a$  e valores de parâmetros termodinâmicos distintos. Entretanto, independente da estequiometria assumida, o comportamento termodinâmico do sistema se manteve, ou seja, o processo de formação do composto de inclusão se mostrou espontâneo e favorecido entropicamente.

É importante ressaltar que o diagrama de solubilidade de fases é uma técnica útil para uma primeira verificação da obtenção do composto de inclusão, sendo pouco precisa quando comparada a técnicas mais sofisticadas utilizadas na caracterização. Existem inúmeros fatores que podem contribuir para propagação de incertezas quando se determina propriedades termodinâmicas utilizando experimento de solubilidade. Neste tipo de estudo os coeficientes estequiométricos e os valores de  $K_a$  não são determinados de forma direta, interferindo nos parâmetros termodinâmicos calculados. Incertezas associadas a interferências externas também precisam ser consideradas, uma vez que os experimentos não são realizados em um sistema adiabático e toda a parte experimental é executada manualmente (KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

### **3.4. Calorimetria de titulação isotérmica**

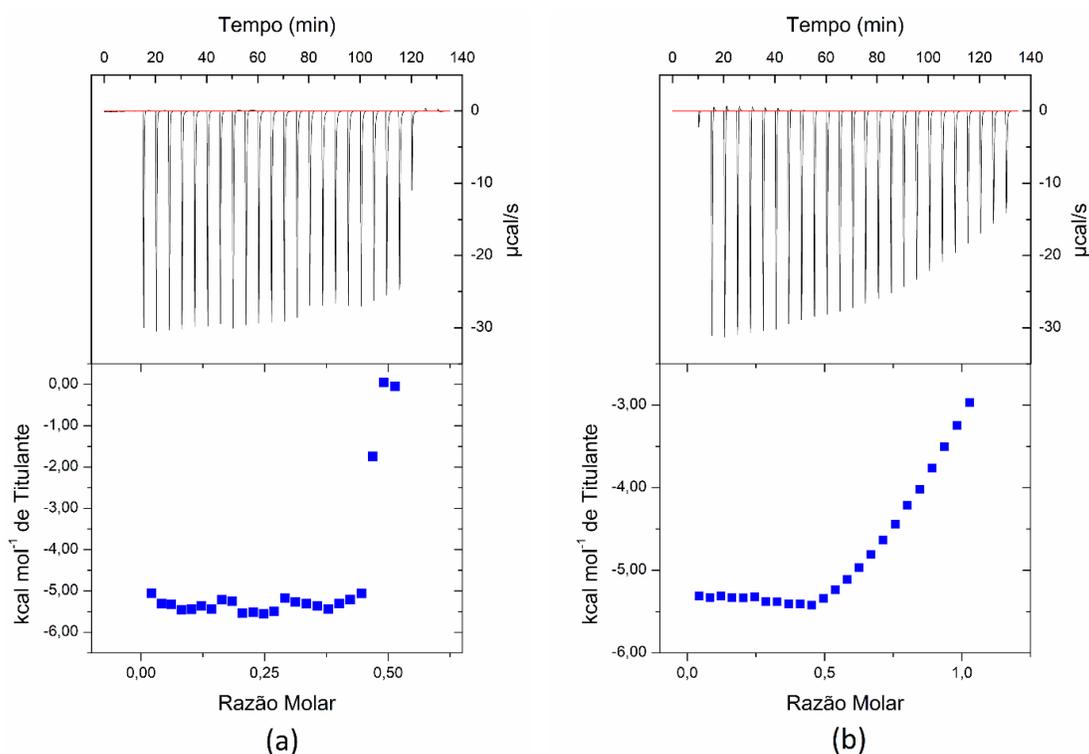
A calorimetria de titulação isotérmica, denominada ITC, é uma das técnicas mais relevantes para estudar o processo de inclusão em sistemas supramoleculares envolvendo CDs, pois em sistemas supramoleculares os processos reacionais envolvem a quebra e a formação de interações intermoleculares (TURNBULL e DARANAS, 2003; BOUCHEMAL, 2008). Logo, essa técnica foi utilizada para a obtenção das estequiometrias, das constantes de associação bem como dos parâmetros termodinâmicos da interação entre o fármaco e a CD nos sistemas  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR.

#### **3.4.1. Sistema $\beta$ CD:BPR**

Para o estudo da interação entre a  $\beta$ CD e o fármaco BPR, inicialmente, foi realizada uma titulação a 37 °C utilizando uma solução aquosa de  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> como titulante e uma

solução aquosa do fármaco BPR 5,0 mmol.L<sup>-1</sup> como titulado. Os resultados obtidos para essa titulação indicaram um excesso do titulado, ou seja, a concentração de βCD não foi suficiente para interagir com todas as moléculas de BPR presentes e finalizar a curva, como pode ser observado na Figura 3.8(a).

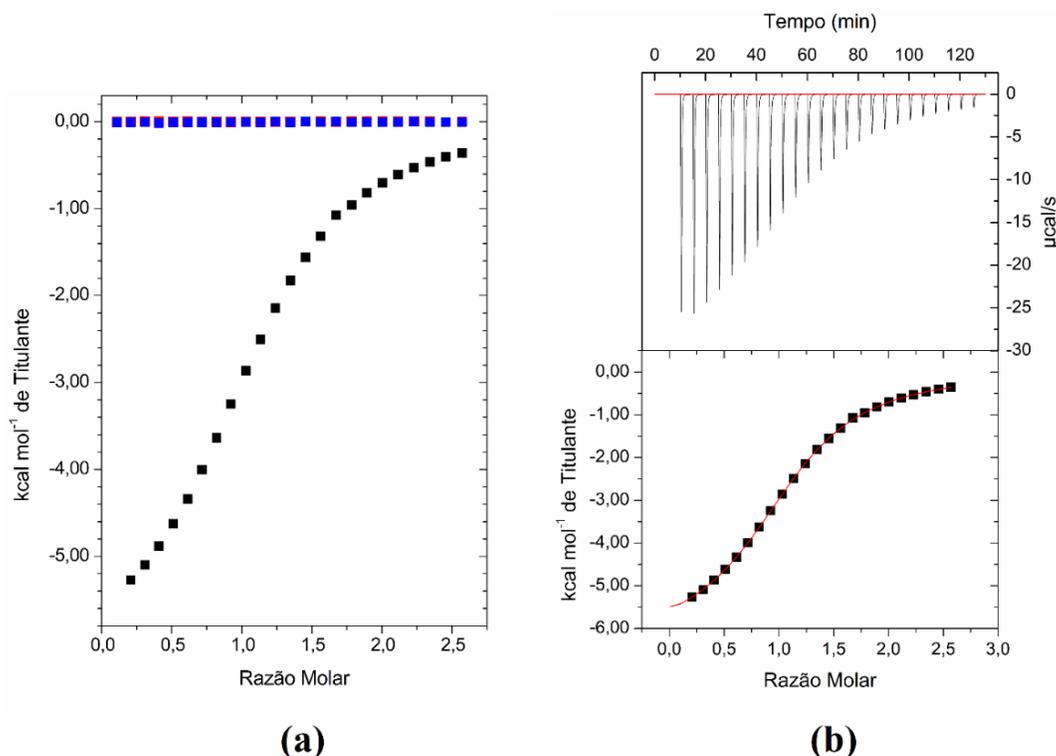
Sendo assim, considerando a baixa solubilidade do fármaco, a concentração de BPR foi diluída para 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> e a concentração de βCD mantida a 14,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Para essa condição, ainda foi possível observar um excesso de titulado, ou seja, mesmo com a diluição da solução de BPR a concentração de titulante não foi suficiente para interagir com todas as moléculas de titulado e finalizar a curva (Figura 3.8(b)).



**Figura 3.8** – Perfil de titulação a 37 °C de (a) βCD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 5,0 mmol.L<sup>-1</sup>; (b) βCD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>.

Dessa forma, a solução de BPR foi diluída para 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> mantendo a concentração da solução de βCD. A Figura 3.9(a), apresenta as curvas de diluição entre a água tipo I e as soluções de βCD e BPR, as quais foram subtraídas com o intuito de eliminar os efeitos da interação entre os compostos e o solvente. O perfil da curva foi próximo de um perfil sigmoide, e os sinais finais

de diferença de calor foram constantes e próximos de zero, conforme esperado (Figura 3.9(b)). Os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste não-linear da curva estão descritos na Tabela 3.4.



**Figura 3.9** – Perfil de titulação a 37 °C: (a) ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.

**Tabela 3.4** – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> a 37, 47 e 57 °C.

T (°C)	N	K <sub>a</sub>	$\Delta H^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$T\Delta S^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$\Delta G^\circ / \text{KJmol}^{-1}$
37	1,1 ± 0,020	6.350,0 ± 240,4	-25,6 ± 1,1	-3,1 ± 1,1	-22,5 ± 0,1
47	1,1 ± 0,010	4.310,0 ± 20,0	-28,8 ± 0,7	-6,6 ± 0,7	-22,3 ± 0,0
57	1,1 ± 0,004	3.060,0 ± 183,8	-30,9 ± 1,6	-8,9 ± 1,7	-22,0 ± 0,2

A partir do ajuste da curva foi possível obter um coeficiente estequiométrico de  $1,1 \pm 0,02$ , correspondente a um composto de inclusão de estequiometria 1:1 ( $\beta$ CD:BPR). Altos valores de  $K_a$  indicam que uma maior concentração de composto de inclusão está presente em solução do que as espécies livres, sendo um forte indicio de interações mais efetivas. (KLOTZ e ROSENBERG,

2008). A curva obtida apresenta um perfil sigmoide característico de sistemas com alta constante de associação descritos na literatura, sugerindo a existência de uma forte interação entre as moléculas  $\beta$ CD e BPR (TURNBULL e DARANAS, 2003; DE SOUSA et al., 2008; MEIRA et al., 2018). O valor de  $K_a$  estimado,  $6.350,0 \pm 240,4$ , confirma tal afirmação, uma vez que o mesmo é relativamente alto quando comparado a outros estudos de compostos de inclusão envolvendo a  $\beta$ CD reportados em literatura (DENADAI et al., 2007; DE PAULA et al., 2012; MOURA et al., 2016; MEIRA et al., 2018).

Com os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  obtidos pelo programa, foi possível calcular  $\Delta G^\circ$  e  $T\Delta S^\circ$  utilizando as equações termodinâmicas descritas no capítulo 1, seção 1.4.2. O processo de formação do composto de inclusão se mostrou espontâneo, dado o valor negativo de  $\Delta G^\circ$  ( $-22,5 \pm 0,1 \text{ kJmol}^{-1}$ ) e exotérmico ( $\Delta H^\circ = -25,6 \pm 1,1 \text{ kJmol}^{-1}$ ).

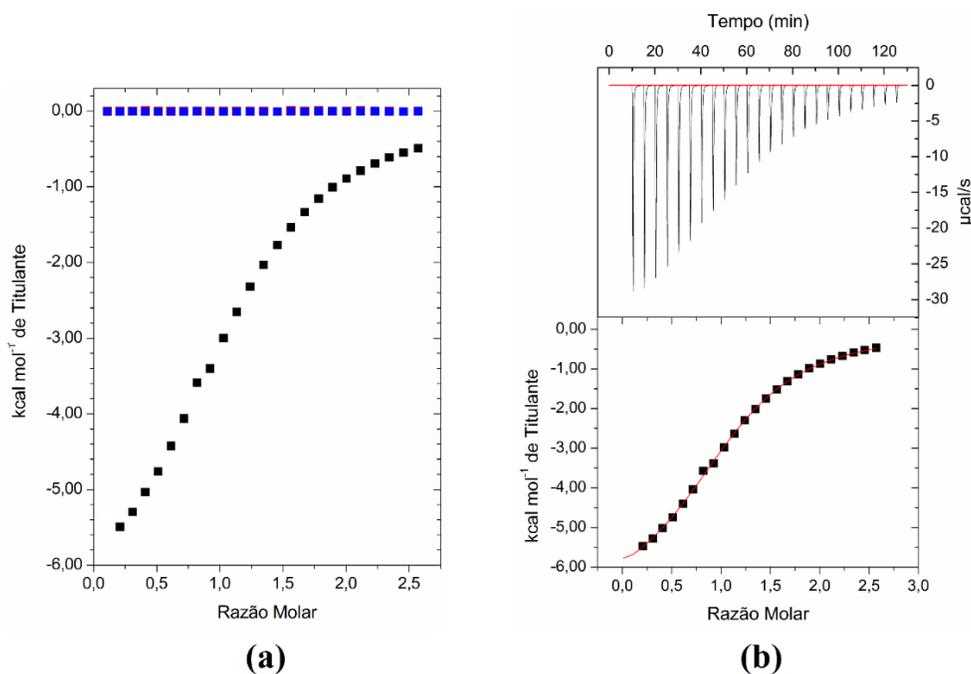
No que se refere ao processo de formação de compostos de inclusão, a contribuição entálpica ( $\Delta H^\circ$ ) está relacionada com a quebra e formação de interações entre as moléculas hóspede e hospedeira, sendo estas mais ou menos estáveis. Desta forma, o processo exotérmico pode estar relacionado com a saída das moléculas de água do interior da cavidade da CD aliada à formação de novas interações cooperativas entre a  $\beta$ CD e o fármaco BPR, considerando o alto valor da constante de associação (REKHARSKY e INOUE, 1998; REKHARSKY et al., 2002; LIU e GIO et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

O termo entrópico está relacionado com o grau de organização do sistema como um todo, logo, o valor negativo de  $T\Delta S^\circ$  ( $-3,1 \pm 1,1 \text{ kJmol}^{-1}$ ) pode estar associado a uma arquitetura mais rígida assumida pelas espécies após a inclusão, com menor liberdade conformacional que a  $\beta$ CD e o BPR livres (REKHARSKY e INOUE, 1998; REKHARSKY et al., 2002; DENADAI et al., 2007; KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

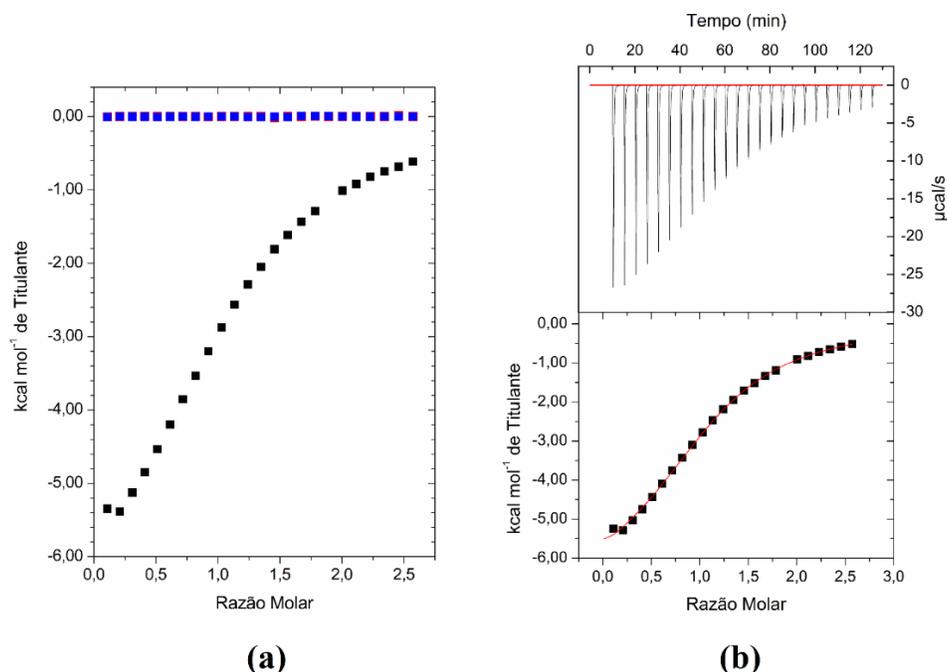
A formação de compostos de inclusão favorecida entropicamente geralmente apresenta um valor de  $T\Delta S^\circ$  grande e positivo, enquanto que  $\Delta H^\circ$  do processo é pequena,  $|\Delta H^\circ| < |T\Delta S^\circ|$ . Já processos favorecidos entalpicamente apresentam um ganho entrópico mínimo ou negativo e alta contribuição entálpica,  $|\Delta H^\circ| > |T\Delta S^\circ|$  (INOUE et al., 1992; REKHARSKY e INOUE, 1998; BOUCHEMAL, 2008). Assim, considerando a alta contribuição entálpica e a redução da entropia, pode-se concluir que o processo de formação do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR é favorecida entalpicamente, sendo necessário um valor muito alto de entropia para superar a entalpia do sistema. Um comportamento termodinâmico muito semelhante foi observado por Stojanov e

colaboradores (2011), a partir de experimentos de ITC a 30 °C, para um sistema envolvendo a  $\beta$ CD e o fármaco Cetirizina. Os dados termodinâmicos obtidos pelos autores mostraram uma alta contribuição entálpica ( $\Delta H^\circ = -4733,00 \text{ KJmol}^{-1}$ ) atrelada a um pequeno valor de entropia ( $T\Delta S^\circ = -9,79 \text{ KJmol}^{-1}$ ), indicando que o processo de formação do composto de inclusão é favorecido entalpicamente (STOJANOV, WIMMER e LARSEN, 2011).

De forma adicional, após o ajuste da concentração das soluções utilizadas, foram realizadas titulações nas temperaturas de 47 e 57 °C com o intuito de observar um perfil termodinâmico em diferentes temperaturas. As curvas de diluição e o perfil das titulações nas temperaturas de 47 e 57 °C estão apresentados nas Figuras 3.10 e 3.11, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste não-linear da curva para tais temperaturas estão descritos na Tabela 3.4.



**Figura 3.10** – Perfil de titulação a 47 °C: (a) ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.



**Figura 3.11** – Perfil de titulação a 57 °C: (a) ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; ■  $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3.4, verifica-se que mesmo com o aumento da temperatura os coeficientes estequiométricos obtidos correspondem a um composto de inclusão de estequiometria 1:1( $\beta$ CD:BPR). A estequiometria obtida por ITC condiz com a estimada observando o diagrama de solubilidade de fases, o qual apresentou um perfil do tipo A<sub>L</sub> conforme já descrito anteriormente, reiterando que para tais perfis razões estequiométricas de 1:1 (CD:Fármaco) são frequentes (DAVIS e BREWSTER, 2004; COUTO, SALÚSTIO e CABRAL-MARQUES, 2014).

Analisando os valores de K<sub>a</sub>, foi possível observar que o aumento da temperatura desfavorece a interação entre BPR e  $\beta$ CD, efeito este também observado por Meira et al. (2018) em outros sistemas envolvendo a  $\beta$ CD (Tabela 3.5). Contudo, os valores obtidos são relativamente altos quando comparados a outros estudos envolvendo a  $\beta$ CD, indicando forte afinidade entre as moléculas BPR e  $\beta$ CD mesmo com variação de temperatura (DENADAI et al., 2007; 2009; DE PAULA et al., 2012; MOURA et al., 2016; MEIRA et al., 2018).

**Tabela 3.5** – Valores de  $K_a$  para sistemas envolvendo a  $\beta$ CD desfavorecidos pelo aumento da temperatura obtidos por Meira *et al.* (2018).

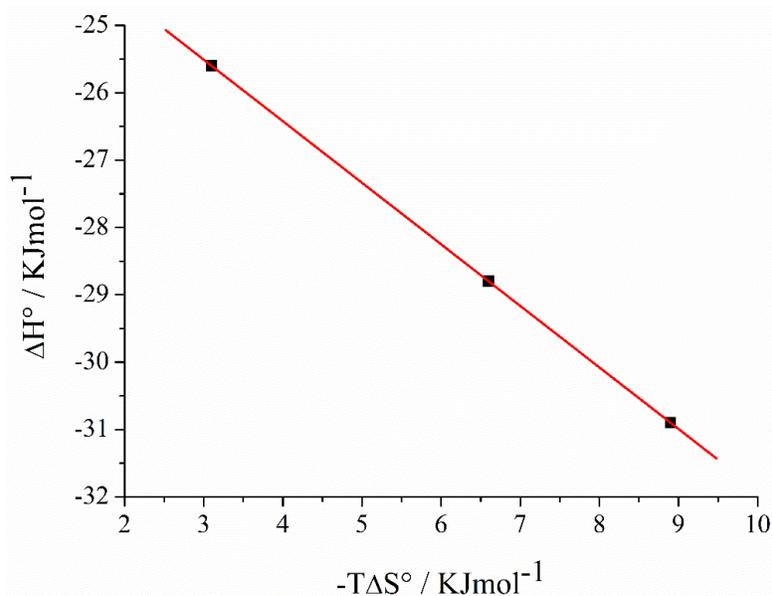
Sistemas	Temperaturas / °C	$K_a$
<b>Dodecil sulfato de sódio:<math>\beta</math>CD</b>	25	22.450,0
	37	17.600,0
	47	16.400,0
<b>Atenolol:<math>\beta</math>CD</b>	25	1.505,0
	37	602,0
	47	515,5
<b>Losartan potássico:<math>\beta</math>CD</b>	25	799,5
	37	505,0
	47	385,0

Quando comparado com o estudo de solubilidade, é possível observar que os valores de  $K_a$  obtidos por ITC, nas três temperaturas em estudo, são bem mais altos do que os determinados pelo diagrama de solubilidade de fase. O fato da técnica de ITC não ter fornecido valores próximos aos determinados no estudo de solubilidade pode ser explicado pela diferença de medição entre as técnicas. Por meio do diagrama de solubilidade de fase os valores de  $K_a$  são determinados a partir de uma análise do perfil de solubilidade e posterior aplicação da equação de Higuchi e Connors, ou seja, tem-se uma medição indireta atrelada a diversos fatores que podem contribuir para a propagação de incertezas (HIGUCHI e CONNORS, 1965; DEL VALLE, 2004; DENADAI, 2006; KLOTZ e ROSENBERG, 2008). Já a técnica de ITC é um método que fornece uma medição direta de  $K_a$  em um sistema com controle de temperatura e adiabático, sendo assim, uma técnica mais seletiva e precisa (TURNBULL e DARANAS, 2003; BOUCHEMAL, 2008; BASTOS e VELAZQUEZ-CAMPOY, 2021).

Os valores de  $\Delta G^\circ$  negativo indicam que o processo se mantém espontâneo mesmo com o aumento da temperatura. Analisando os valores de  $\Delta H^\circ$  nota-se que o processo fica mais exotérmico com o aumento da temperatura e há uma diminuição nos valores de  $T\Delta S^\circ$ , indicando que o processo de formação do composto de inclusão se mantém entalpicamente favorável mesmo com o aumento da temperatura. Portanto, é possível concluir que o aumento da temperatura não altera o comportamento termodinâmico do sistema  $\beta$ CD:BPR. De forma complementar, para as três temperaturas, os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC foram distintos dos determinados no estudo de solubilidade, fato este que também pode ser explicado pela medição indireta aplicada no último. Entretanto, mesmo com valores distintos, o mesmo comportamento termodinâmico foi observado no estudo de solubilidade para este sistema.

Entender variáveis de entalpia e entropia do sistema são fundamentais, uma vez que o reconhecimento molecular em sistemas hóspedes e hospedeiros dependem de inúmeras interações intermoleculares, principalmente quando o faz parte do sistema. Neste sentido, forças atrativas eletrostáticas e de van der Waals são assumidas como resultando em uma entalpia de ligação, enquanto as forças hidrofóbicas são, supostamente, caracterizadas por um grande ganho de entropia. Logo, a compensação entálpica/entrópica pode ser definida como o processo no qual a contribuição entálpica pode ser compensada por uma contribuição entrópica similar, porém de direção oposta.

Logo, foi observada uma variação mínima nos valores de  $\Delta G^\circ$ , o que pode ser atribuída a compensação entálpica/entrópica. Esse fenômeno tem sido amplamente discutido na literatura e avalia-se que uma mudança na entalpia do sistema é compensada por uma mudança na entropia e vice-versa, logo, espera-se uma variação linear entre entalpia e entropia (KRUG, HUNTER e GRIEGER, 1976; INOE et al., 1993; BOUCHEMAL et al., 2009; FREIRE,2008). A Figura 3.12 traz a correlação linear entre os pontos  $\Delta H^\circ$  e  $-T\Delta S^\circ$  nas diferentes temperaturas estudadas, obtendo-se um coeficiente de correlação igual a -1 ( $R^2 = -1$ ). Dessa forma, é possível constatar que à medida que o valor de  $\Delta H^\circ$  aumenta o valor de  $T\Delta S^\circ$  diminuí, sendo um indício da existência do efeito de compensação entálpica/entrópica no sistema.

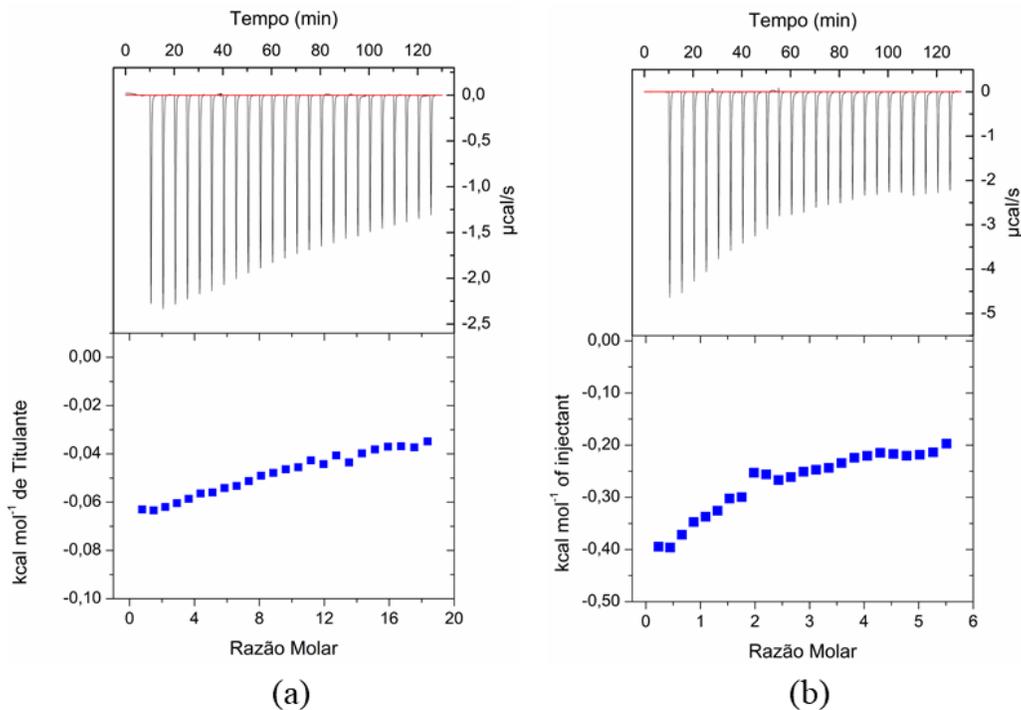


**Figura 3.12** – Gráfico de compensação entálpica/entrópica correspondente ao sistema  $\beta\text{CD}$  14,0  $\text{mmol.L}^{-1}$  e BPR 1,0  $\text{mmol.L}^{-1}$  nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.

### 3.4.2. Sistema HP $\beta$ CD:BPR

Para a análise da interação entre a HP $\beta$ CD e o fármaco BPR, inicialmente, foi realizada uma titulação a 37 °C utilizando uma solução aquosa de HP $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> como titulante e uma solução aquosa de BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> como titulado. Entretanto, não foi obtida uma curva definida como esperado e a diferença de calor resultante da interação mostrou valores pequenos e que pouco variaram no decorrer da titulação (Figura 3.13(a)).

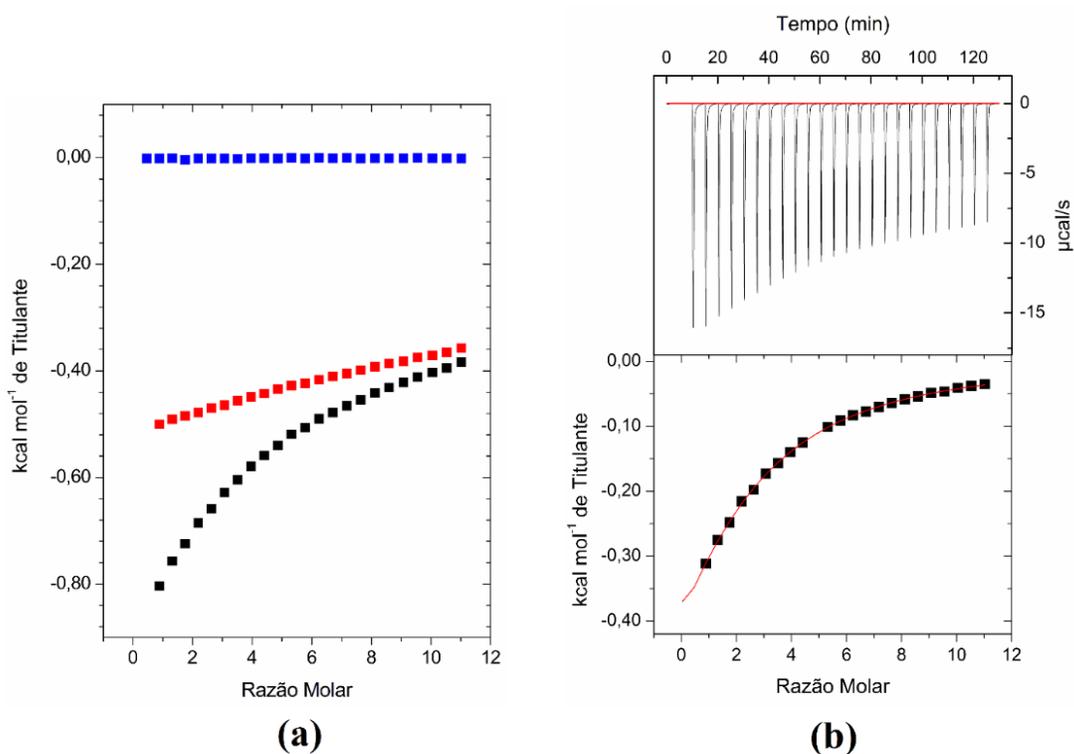
Sendo assim, para tentar melhorar os resultados, aumentou-se a concentração de HP $\beta$ CD para 30,0 mmol.L<sup>-1</sup> mantendo a concentração de BPR e uma nova titulação foi realizada. Nestas condições, embora a diferença de calor resultante da interação tenha apresentado valores um pouco maiores estes ainda eram pequenos e a curva obtida ainda não estava bem definida (Figura 3.13(b)).



**Figura 3.13** – Perfil de titulação a 37 °C de (a) HP $\beta$ CD 14,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; (b) HP $\beta$ CD 30,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>.

Dessa forma, foi realizada uma nova titulação com uma solução aquosa de HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em uma solução aquosa de BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Como resultando nestas condições, a

diferença de calor resultante da interação mostrou valores um pouco maiores do que nas condições anteriores, mas estes ainda eram relativamente pequenos. Entretanto, foi obtida uma curva definida a qual mesmo fora do perfil sigmoide esperado se ajustou ao modelo aplicado, sendo possível obter os dados termodinâmicos. As curvas de diluição entre a água tipo I e as soluções de HP $\beta$ CD e BPR estão apresentadas na Figura 3.14 (a) Tais curvas foram subtraídas para eliminar os efeitos da interação entre os compostos e o solvente. A Figura 3.14 (b) mostra o perfil de titulação após a subtração da interação com o solvente. Os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste não-linear da curva estão descritos na Tabela 3.6.



**Figura 3.14** – Perfil de titulação HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> a 37 °C.

**Tabela 3.6** – Parâmetros termodinâmicos para os sistemas HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> a 37, 47 e 57 °C.

T (°C)	N	K <sub>a</sub>	$\Delta H^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	T $\Delta S^\circ / \text{KJmol}^{-1}$	$\Delta G^\circ / \text{KJmol}^{-1}$
37	2,2 ± 0,2	418,0 ± 29,7	-3,0 ± 0,1	12,5 ± 0,2	-15,6 ± 0,2
47	2,3 ± 0,1	423,5 ± 14,8	-4,2 ± 0,3	11,8 ± 0,4	-16,1 ± 0,1
57	2,3 ± 0,1	454,0 ± 43,1	-5,6 ± 0,0	11,2 ± 0,2	-16,6 ± 0,1

O ajuste da curva permitiu obter um coeficiente estequiométrico de  $2,2 \pm 0,2$ . O valor fracionado sugere a formação de equilíbrios múltiplos em solução, sendo um indicio de que compostos de inclusão com diferentes estequiometrias coexistem em equilíbrio. Resultados semelhantes têm sido relatados para outros sistemas supramoleculares envolvendo CDs e diferentes moléculas hóspedes (DE SOUSA et al., 2008; PASSOS et al., 2011; DE PAULA et al., 2012; MEIRA et al., 2018).

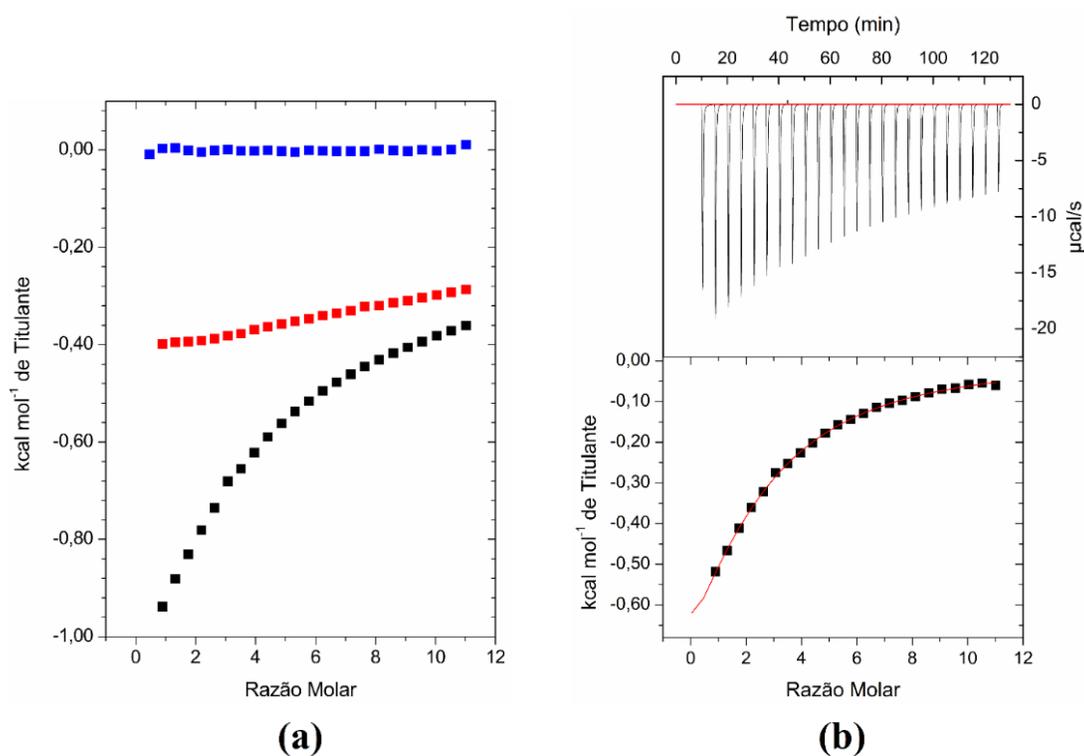
O valor de  $K_a$  estimado ( $418,0 \pm 29,7$ ) foi pequeno quando comparado ao sistema  $\beta$ CD:BPR ( $6.350,0 \pm 240,4$ ), sugerindo uma interação mais fraca entre o fármaco BPR e a HP $\beta$ CD. A fraca interação entre as entidades também foi verificada pelo perfil da curva, que não apresenta uma inflexão acentuada, característica de sistemas com fortes interações e alto valor de  $K_a$  (TURNBULL e DARANAS, 2003; DE SOUSA et al., 2008; PASSOS et al., 2011; MEIRA et al., 2018). Valores mais baixos de  $K_a$  são descritos em outros estudos envolvendo a molécula HP $\beta$ CD reportados na literatura (FERNANDES et al., 2007; DE PAULA et al., 2011; GONTIJO et al., 2015). A diferença dos valores de  $K_a$  entre os sistemas estudados pode ser atribuída a presença do grupo hidroxipropil na molécula de HP $\beta$ CD. A presença de um grupo volumoso na molécula HP $\beta$ CD, pode ocasionar uma maior dificuldade da mesma em se aproximar da molécula de BPR do que a  $\beta$ CD, devido ao impedimento estérico.

Mesmo com uma constante de associação baixa, o processo de formação do composto de inclusão foi espontâneo ( $\Delta G^\circ = -15,5 \pm 0,2 \text{ KJmol}^{-1}$ ) e exotérmico ( $\Delta H^\circ = -3,0 \pm 0,1 \text{ KJmol}^{-1}$ ). Como a  $\Delta H^\circ$  do sistema pode ser associada a saída das moléculas de água do interior da cavidade da CD para acomodar a molécula hospedeira, e com a formação de possíveis interações cooperativas entre as duas moléculas, o baixo valor de  $\Delta H^\circ$  reforça a existência de interações mais fracas entre a HP $\beta$ CD e o fármaco BPR. Já o termo entrópico, o qual está relacionado com o grau de desordem do sistema, se mostrou positivo ( $T\Delta S^\circ = 12,5 \pm 0,2 \text{ KJmol}^{-1}$ ), o que pode estar associado tanto ao efeito hidrofóbico resultante da liberação das moléculas de água da cavidade da HP $\beta$ CD quanto da existência de equilíbrios múltiplos, aumentando o número de espécies em solução (REKHARSKY e INOUE, 1998; FERNANDES et al., 2007; DE SOUSA et al., 2008; MORAIS et al., 2016; MEIRA et al., 2018).

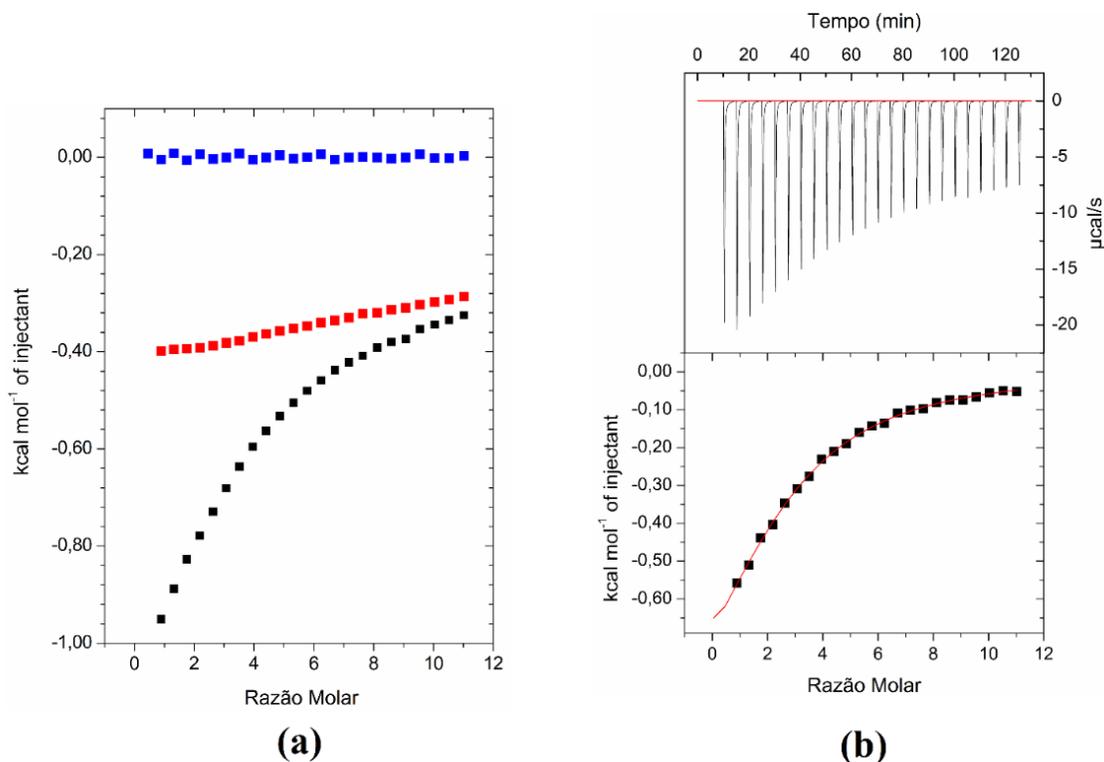
Como já mencionado na seção 3.4.1 deste capítulo, processos que apresentam um valor de  $T\Delta S^\circ$  positivo e  $\Delta H^\circ$  pequena,  $|\Delta H^\circ| < |T\Delta S^\circ|$ , são favorecidos entropicamente (INOUE et al., 1992; REKHARSKY e INOUE, 1998; BOUCHEMAL, 2008). Logo, a baixa contribuição

entálpica atrelada a um ganho entrópico, observados no sistema em questão, mostram que a formação do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR é favorecida pela entropia.

De forma complementar, após o ajuste da concentração das soluções utilizadas, para este sistema também foram realizadas titulações adicionais com o intuito de obter um perfil termodinâmico em diferentes temperaturas. As curvas de diluição bem como o perfil das titulações nas temperaturas de 47 e 57 °C estão apresentados nas Figuras 3.15 e 3.16, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste não-linear da curva para as temperaturas em estudo estão descritos na Tabela 3.6.



**Figura 3.15** – Perfil de titulação a 47 °C: (a) ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; ■ HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.

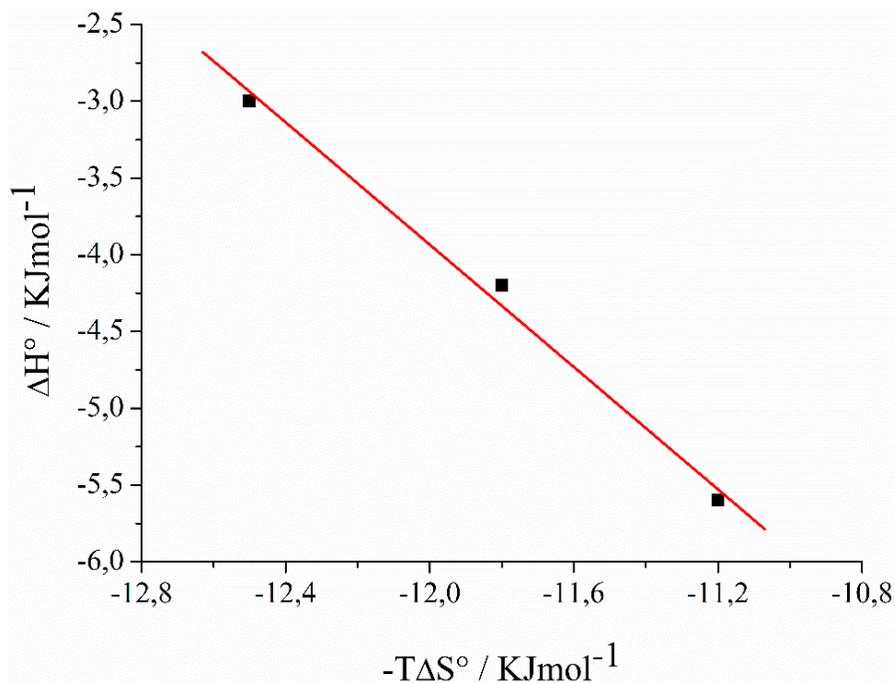


**Figura 3.16** – Perfil de titulação a 57 °C: (a) ■ HPβCD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em água tipo I; ■ água tipo I em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; ■ HPβCD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> em BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. (b) Curva final após subtração dos efeitos de interação e ajuste não-linear.

Com base nos valores apresentados na Tabela 3.6, verifica-se que à 47e 57 °C os coeficientes estequiométricos também apresentaram valores fracionados, o que sugere a formação de equilíbrios múltiplos em solução, como descrito para o sistema à 37 °C. Além disso, foi observado que o aumento da temperatura favoreceu a interação entre BPR e HPβCD, verificado pelo aumento dos valores de  $K_a$ . Contudo, tais valores são relativamente baixos quando comparados aos obtidos no sistema envolvendo a βCD e o fármaco BPR para as mesmas temperaturas. Para este sistema, utilizando a técnica de ITC, os valores de  $K_a$  estimados também não foram próximos aos determinados no estudo de solubilidade. Tal fato está atrelado a diferença de medição entre as técnicas, uma vez que a última não apresenta medições diretas, estando associada a fatores que contribuem para propagação de incertezas, conforme elucidado anteriormente (HIGUCHI e CONNORS, 1965; DEL VALLE, 2004; DENADAI, 2006; KLOTZ e ROSENBERG, 2008).

Os valores negativos obtidos para  $\Delta G^\circ$  indicam que mesmo com o aumento da temperatura o processo se mantém espontâneo. Para as três temperaturas em estudo foram observados pequenos valores de  $\Delta H^\circ$  e valores positivos de  $T\Delta S^\circ$ , sendo ainda constatado uma diminuição da entalpia atrelada a um ganho entrópico com o aumento de temperatura. Tais resultados indicam que a formação do composto de inclusão se mantém favorecida entropicamente e que o aumento da temperatura não altera o comportamento termodinâmico do sistema HP $\beta$ CD:BPR. Para este sistema, os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC também foram diferentes dos determinados no estudo de solubilidade para as duas estequiometrias assumidas no último, porém, o mesmo comportamento termodinâmico foi observado mediante ambas as técnicas.

De forma complementar, uma pequena variação nos valores de  $\Delta G^\circ$  foi observada, podendo ser atribuída ao fenômeno de compensação entálpica/entrópica. No gráfico de compensação apresentado na Figura 3.17 é possível observar uma boa correlação linear entre os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $-T\Delta S^\circ$  ( $R^2 = -0,996$ ). Logo, a diminuição entálpica acompanhada de um aumento da entropia é um indicativo da existência do efeito de compensação entálpica/entrópica no sistema.

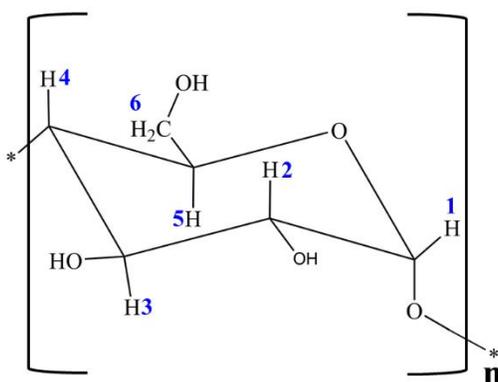


**Figura 3.17** – Gráfico de compensação entálpica/entrópica correspondente ao sistema HP $\beta$ CD 60,0 mmol.L<sup>-1</sup> e BPR 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> nas temperaturas de 37, 47 e 57 °C.

### 3.5. Ressonância magnética nuclear

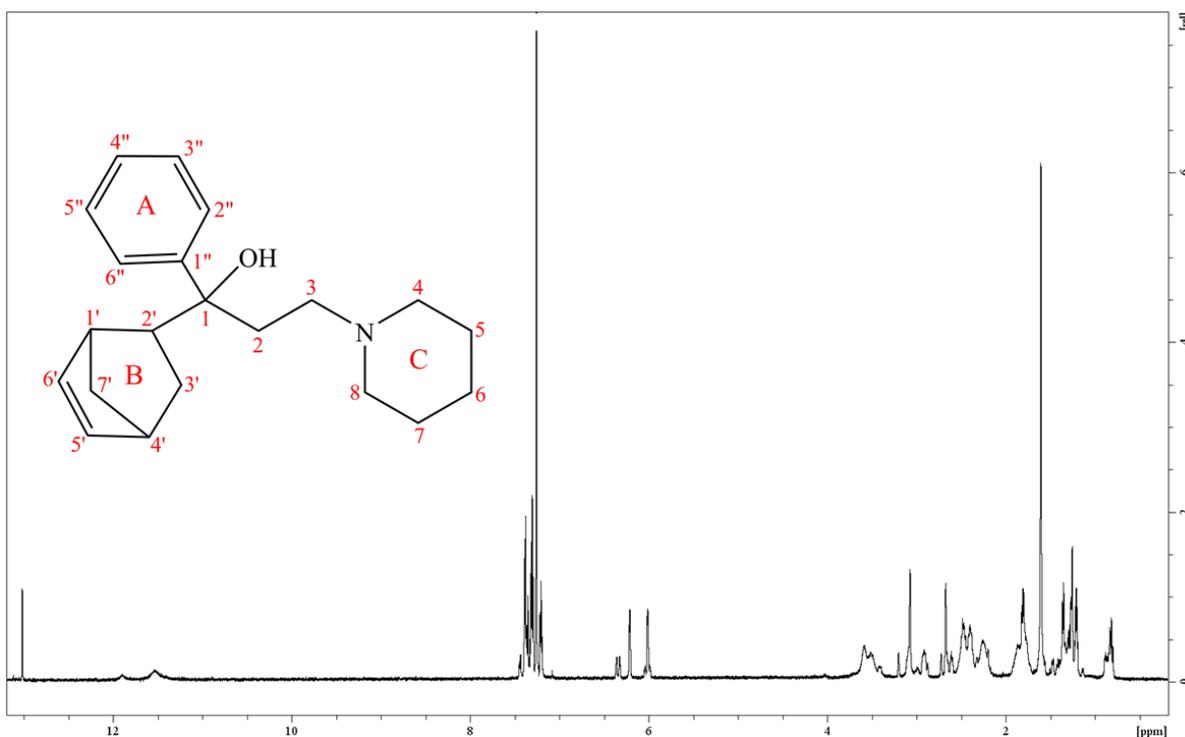
A espectroscopia de RMN, é a técnica mais importante para a verificação da efetividade da inclusão, pois a mesma auxilia na compreensão dos sítios de interação entre a molécula hóspede e a cavidade da CD (SCHNEIDER, 1998; MURA, 2014). Portanto, experimentos de RMN uni- e bidimensionais foram realizados para a confirmação da formação dos compostos de inclusão  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR.

Para as moléculas de CD estudadas não foi necessária uma discussão dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , uma vez que a mesma já é muito bem elucidada na literatura em diferentes solventes. Schneider (1998), detalha em seu trabalho as atribuições dos sinais dos hidrogênios para CDs em diferentes solventes. Considerando os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  para  $\beta$ CD a 400 MHz, utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente, o autor demonstrou que os hidrogênios internos da CD, H3, H5 e H6, apresentam valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) próximos de 3,58, 3,47 e 3,48 ppm, respectivamente. Já os hidrogênios externos da CD, H1, H2 e H4, apresentam valores  $\delta$  próximos de 4,68, 3,26 e 3,19 ppm, respectivamente. Os hidrogênios das hidroxilas não aparecem pois estes são trocados pelo átomo de deutério do solvente (SCHNEIDER, 1998). Como a HP $\beta$ CD é uma CD derivada da  $\beta$ CD as atribuições descritas acima também são aplicáveis a mesma. A Figura 3.18 traz a representação estrutural de um monômero glicosídico de CD com respectiva identificação dos hidrogênios internos e externos.



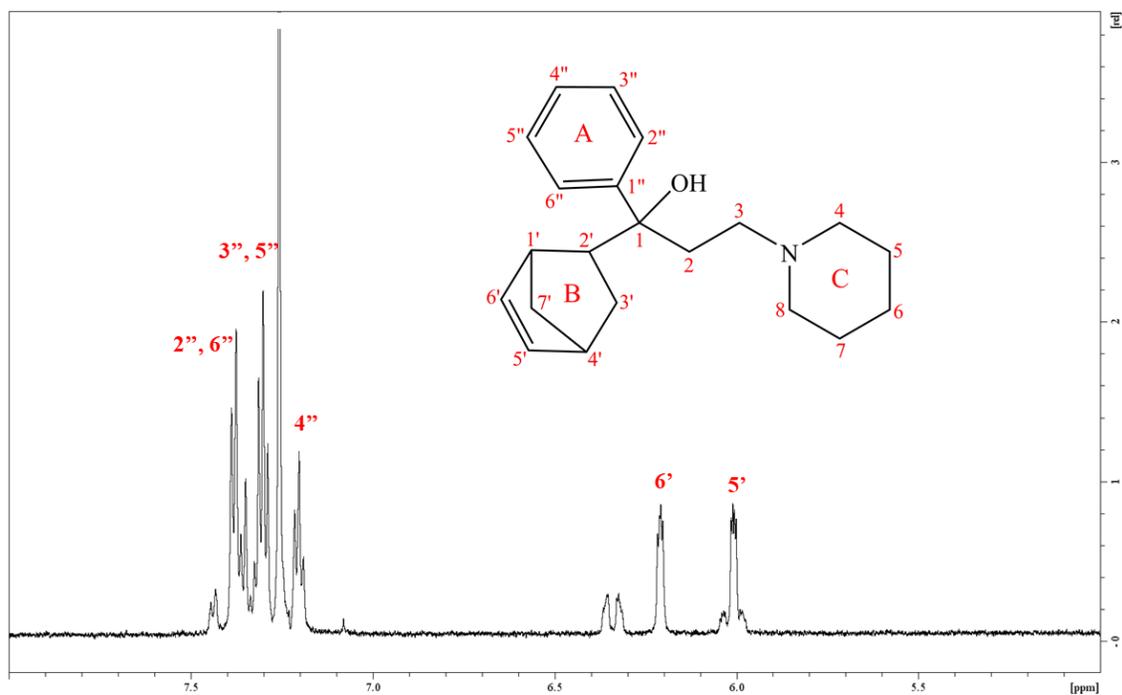
**Figura 3.18** – Representação estrutural do monômero glicosídico da CD com respectiva identificação dos hidrogênios.

Os hidrogênios do fármaco BPR livre foram atribuídos com base em uma análise conjunta de experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais de correlação homo- e heteronucleares. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do BPR obtido a 600 MHz, em  $\text{CDCl}_3$ , está apresentado na Figura 3.19. O fármaco BPR apresenta em sua estrutura química quatro carbonos estereogênicos, que resulta na presença de diferentes enantiômeros, dificultando as atribuições. Logo, o  $\text{CDCl}_3$  foi utilizado como solvente a fim de obter espectros com melhor resolução, e assim, ser possível a atribuição dos sinais de ressonância do isômero majoritário.

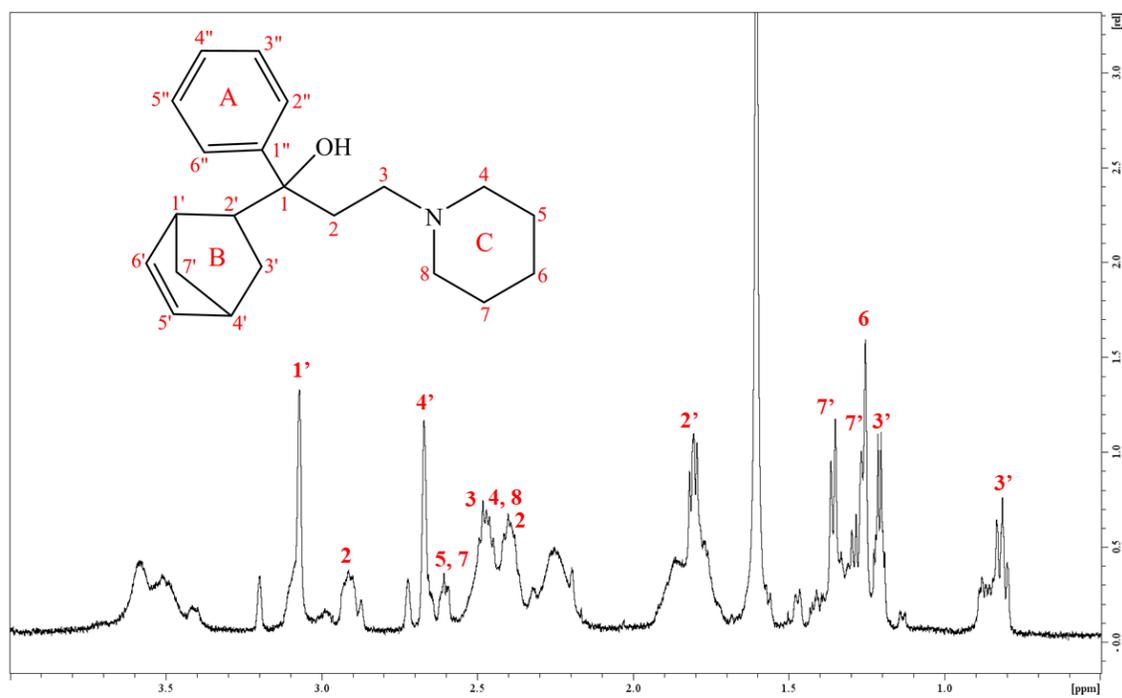


**Figura 3.19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do BPR a 600 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

Para uma melhor visualização dos sinais de hidrogênio do BPR foram montadas expansões do seu espectro de hidrogênio em duas regiões, sendo a primeira delas na região de  $\delta$  entre 5,0 a 8,0 ppm, e a segunda na região de  $\delta$  entre 0,5 a 4,0 ppm. As expansões supracitadas estão apresentadas nas Figuras 3.20 e 3.21, respectivamente.



**Figura 3.20** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do BPR para a região de  $\delta$  entre 5,0 a 8,0 ppm.



**Figura 3.21** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do BPR para a região de  $\delta$  entre 0,5 a 4,0 ppm.

As atribuições dos sinais dos hidrogênios para o isômero majoritário do BPR encontram-se apresentadas na Tabela 3.7. Os sinais de hidrogênio observados para o BPR estão de acordo com aqueles relatados na literatura, também utilizando o  $\text{CDCl}_3$  como solvente e considerando as atribuições apenas do isômero majoritário (KUZ'MINA et al., 2017).

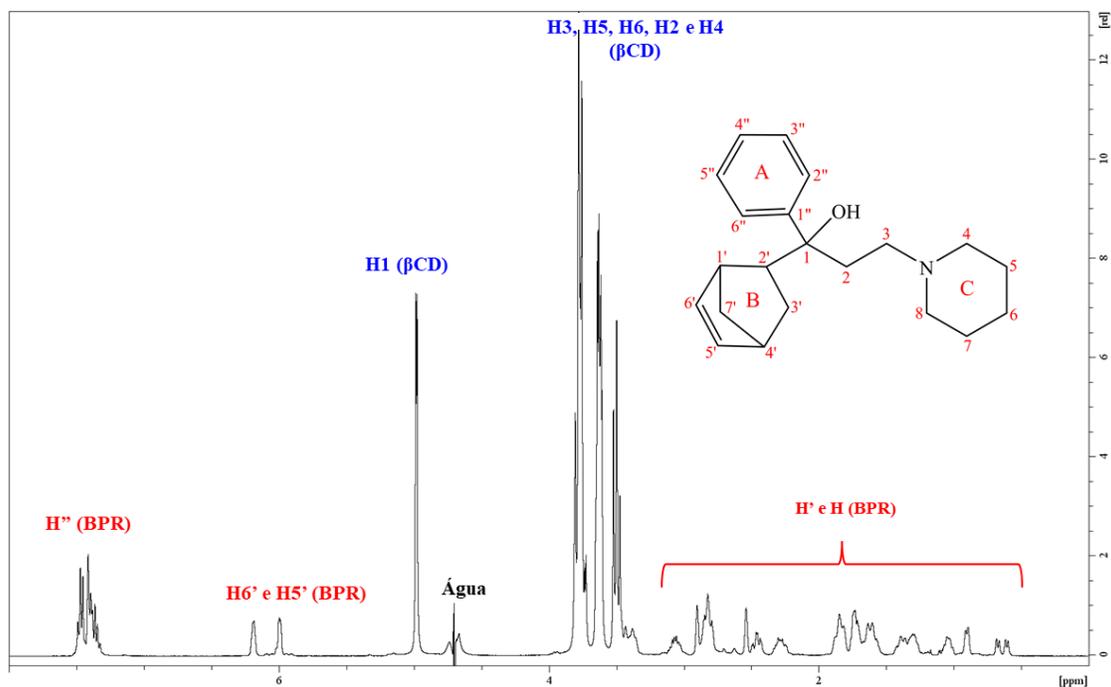
**Tabela 3.7** – Valores de descolamento químico ( $\delta$ ) para os hidrogênios do isômero majoritário de BPR, a 600 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

<b>Hidrogênios</b>	$\delta$ $^1\text{H}$ / ppm	<b>Hidrogênios</b>	$\delta$ $^1\text{H}$ / ppm	<b>Hidrogênios</b>	$\delta$ $^1\text{H}$ / ppm
1' -CH	3,07	2'' -CH	7,39	2 -CH <sub>2</sub>	2,39 e 2,91
2' -CH	1,81	3'' -CH	7,30	3 -CH <sub>2</sub>	2,46 e 3,20
3' -CH <sub>2</sub>	0,81 e 1,22	4'' -CH	7,21	4 -CH <sub>2</sub>	2,40
4' -CH	2,67	5'' -CH	7,30	5 -CH <sub>2</sub>	2,61
5' =CH	6,01	6'' -CH	7,39	6 -CH <sub>2</sub>	1,27
6' =CH	6,21			7 -CH <sub>2</sub>	2,61
7' -CH <sub>2</sub>	1,27 e 1,35			8 -CH <sub>2</sub>	2,40

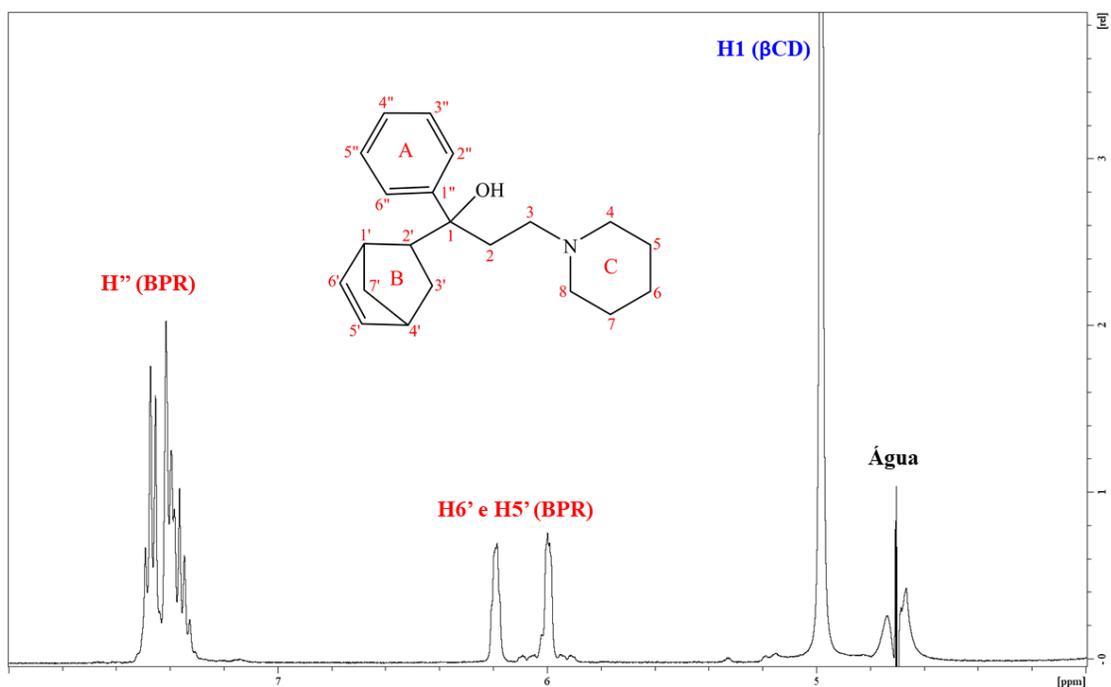
Com base nas atribuições dos hidrogênios do fármaco BPR e considerando as atribuições dos hidrogênios das CDs já bem elucidadas na literatura, conforme já mencionado, foi possível avaliar a formação dos compostos de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  e  $\text{HP}\beta\text{CD}:\text{BPR}$  na razão molar de 1:1. Logo, os compostos de inclusão foram analisados utilizando a combinação de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e ROESY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ .

### 3.5.1. Sistema $\beta\text{CD}:\text{BPR}$

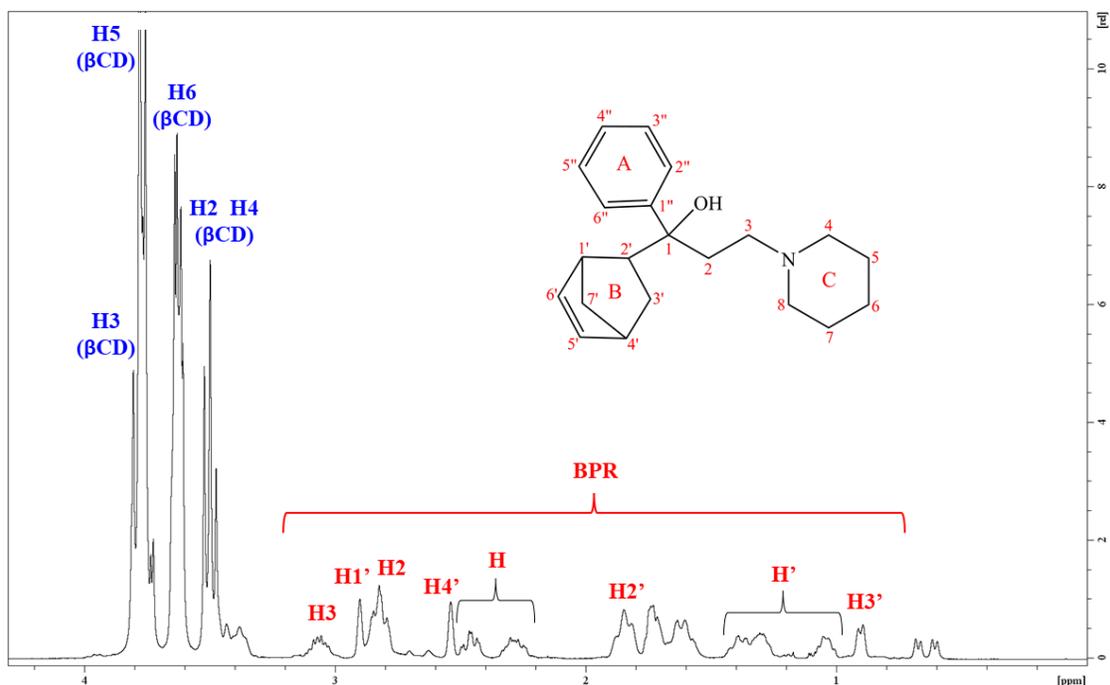
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  foi realizado a 600 MHz, utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente. O referido espectro encontra-se apresentado na Figura 3.22 com as respectivas atribuições de sinais de hidrogênio da  $\beta\text{CD}$  e do BPR. Adicionalmente, para uma melhor visualização dos sinais de hidrogênio, expansões do espectro de hidrogênio do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  são apresentadas nas Figuras 3.23 e 3.24.



**Figura 3.22** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  a 600 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio.



**Figura 3.23** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  para a região de  $\delta$  entre 4,0 a 8,0 ppm.

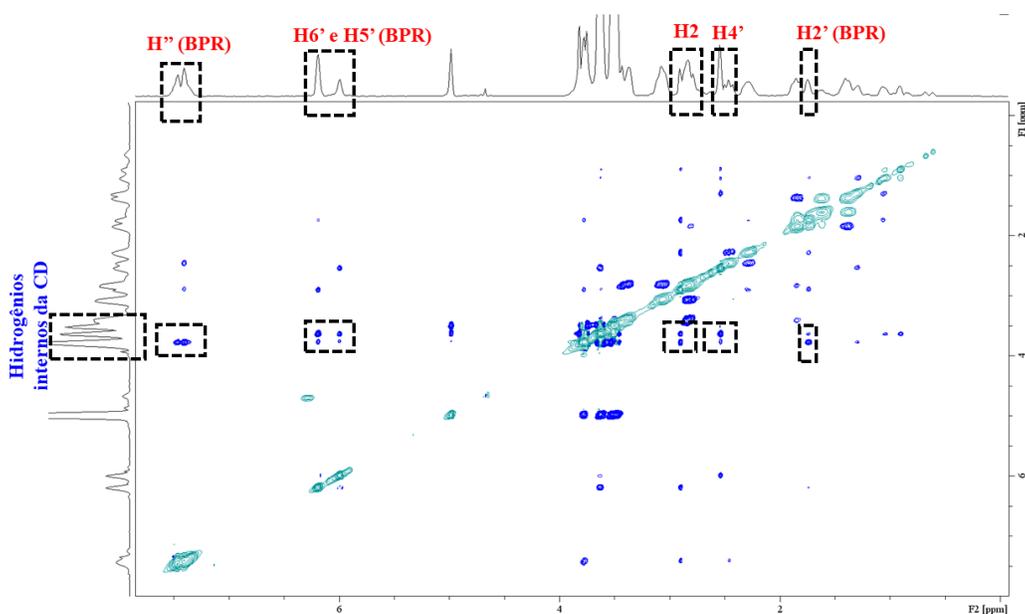


**Figura 3.24** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  para a região de  $\delta$  entre 0,0 a 4,2 ppm.

Experimentos de RMN  $^1\text{H}$  são importantes para a confirmação da efetividade de inclusão a partir da variação dos deslocamentos químicos de hidrogênios livres e envolvidos no composto de inclusão (SCHNEIDER, 1998; MURA, 2014). Entretanto, como os experimentos para o fármaco BPR precisaram ser realizados utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente, e não  $\text{D}_2\text{O}$  como os compostos de inclusão, não é possível avaliar a variação de  $\delta$  dos hidrogênios. Para os compostos de inclusão recomenda-se que os experimentos sejam conduzidos em água/ $\text{D}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2\text{O}$ , uma vez que pode haver uma competição de outros solventes com a cavidade da CD, afetando o composto formado. Embora não seja possível avaliar a variação de deslocamentos químicos, foi observado a presença tanto dos hidrogênios da  $\beta\text{CD}$  quanto do fármaco BPR no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$ .

De forma complementar, foram conduzidos experimentos 2D ROESY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  para confirmar as correlações espaciais a curta distância entre os hidrogênios do BPR e os hidrogênios da  $\beta\text{CD}$ . Tal análise permite a compreensão dos sítios de interação entre as moléculas hóspede e hospedeira, e assim, a confirmação da inclusão (SCHNEIDER, 1998; MURA, 2014). O mapa de correlação espacial do composto de inclusão  $\beta\text{CD}:\text{BPR}$  está apresentado na Figura 3.25.

No mapa de correlação 2D-ROESY foram observadas manchas de correlação a curta distância entre os hidrogênios H'' do anel aromático, denominado A, do fármaco e os hidrogênios internos da CD. Também são observadas manchas de correlação a curta distância entre os hidrogênios, H2', H4', H5' e H6' do anel B e H2, pertencentes ao fármaco BPR, e os hidrogênios internos da CD. Tais correlações confirmam a inclusão do fármaco na cavidade da  $\beta$ CD e indicam que a inclusão ocorre tanto pelo anel aromático A quanto pelo anel B do BPR. Considerando a estequiometria determinada por ITC (1:1) e o grande tamanho da molécula de BPR, pode-se pressupor que composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR (1:1) em diferentes formas de inclusão coexistam em solução. Adicionalmente, a quantidade e a intensidade das manchas de correção presentes no mapa confirma a existência de fortes interações entre as moléculas de BPR e  $\beta$ CD, corroborando com os resultados de ITC. Outras correlações menos evidentes foram consideradas ruídos.



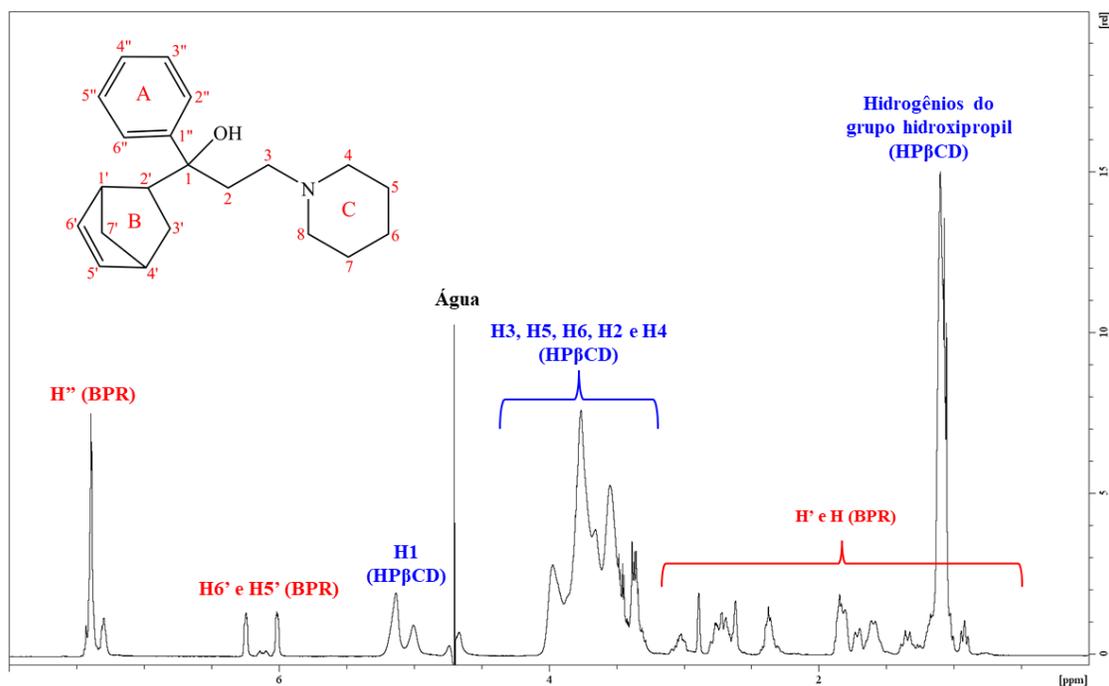
**Figura 3.25** – Mapa de correlação de RMN 2D-ROESY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR a 600 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos principais sinais de hidrogênio.

### 3.5.2. Sistema HP $\beta$ CD:BPR

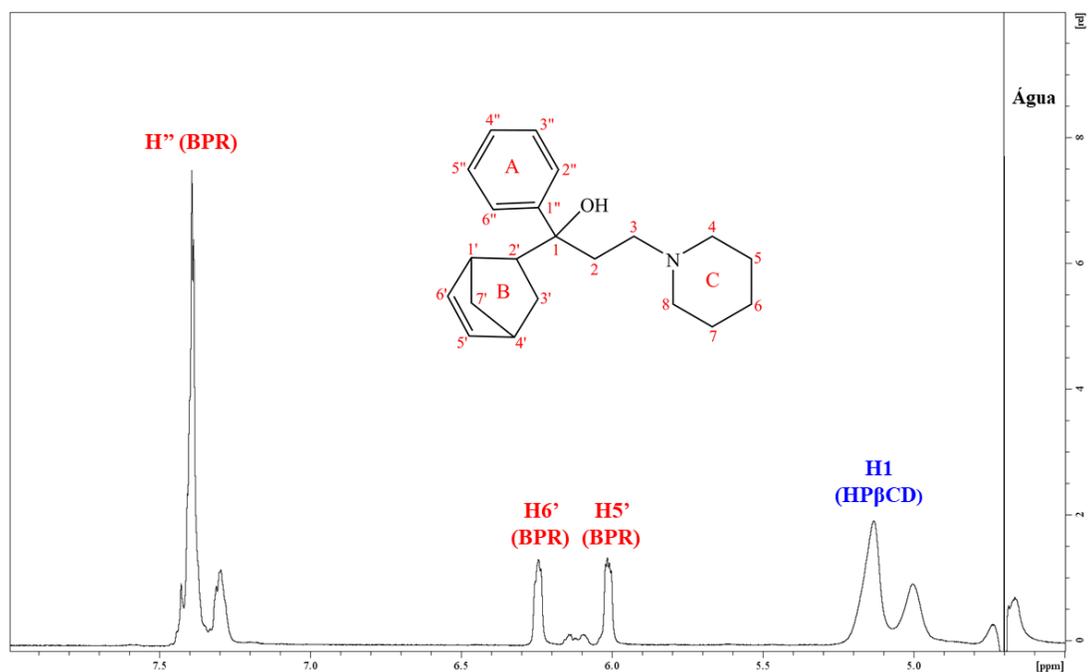
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR a 600 MHz, em  $\text{D}_2\text{O}$ , encontra-se apresentado na Figura 3.26 com as respectivas atribuições de sinais de hidrogênio da

HP $\beta$ CD e do BPR. De forma adicional, expansões do espectro de hidrogênio do composto de inclusão  $\beta$ CD:BPR são apresentadas nas Figuras 3.27 e 3.28, para uma melhor visualização dos sinais de hidrogênio.

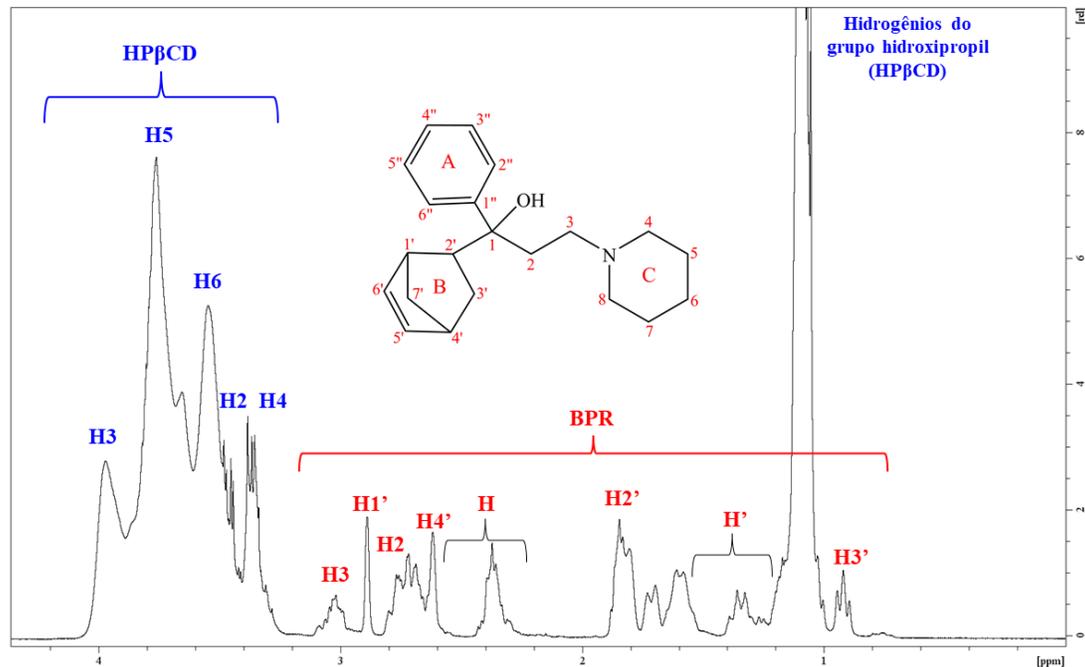
Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  para o fármaco BPR livre e para o composto HP $\beta$ CD:BPR também foram conduzidos em diferentes solventes,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{D}_2\text{O}$ , respectivamente. Como já mencionado, devido a presença de isômeros do fármaco, fez-se necessário a mudança de solvente do experimento de RMN  $^1\text{H}$  do BPR para a obtenção de um espectro de maior resolução. Logo, conforme a discussão para o sistema  $\beta$ CD:BPR, não é possível avaliar a variação de  $\delta$  dos hidrogênios para esse sistema. Entretanto, embora não seja possível avaliar a variação de deslocamentos químicos, a presença tanto dos hidrogênios da HP $\beta$ CD quanto do fármaco BPR foram observadas no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto HP $\beta$ CD:BPR.



**Figura 3.26** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR a 600 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos sinais de hidrogênio.



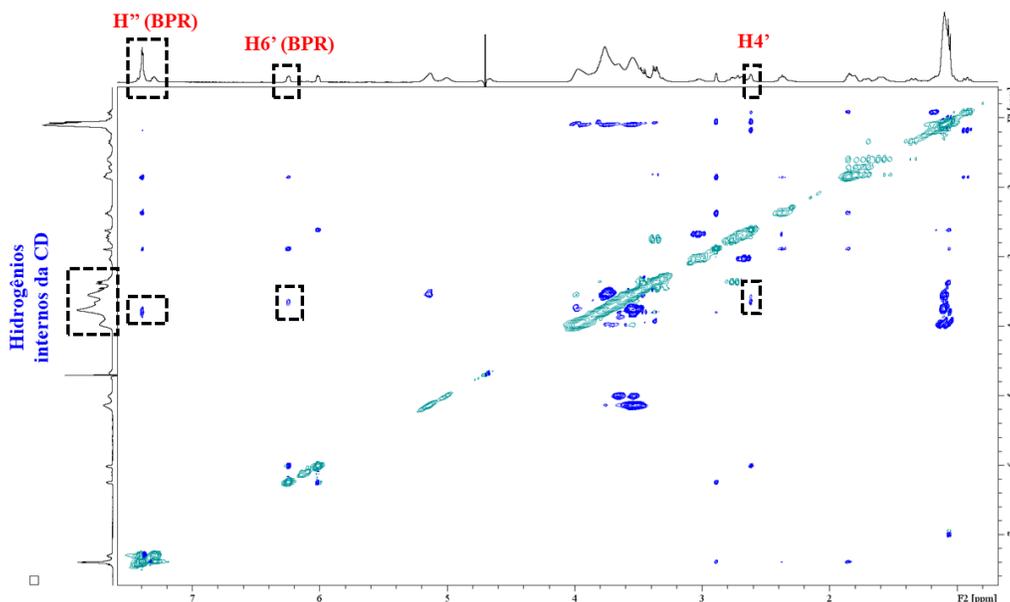
**Figura 3.27** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR para a região de  $\delta$  entre 4,5 a 8,0 ppm.



**Figura 3.28** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR para a região de  $\delta$  entre 0,0 a 4,4 ppm.

De forma complementar, a Figura 3.29. apresenta o mapa de correlação espacial 2D-ROESY do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR, permitindo uma avaliação da correção espacial entre os hidrogênios do BPR e da HP $\beta$ CD. Para esse sistema, foram observadas manchas de correlação a curta distância entre os hidrogênios H'' do anel aromático (A) e H6' e H4' do anel B do fármaco BPR e os hidrogênios internos da cavidade da CD. As correlações supracitadas confirmam a inclusão do fármaco BPR na cavidade da CD e indicam que a inclusão ocorre tanto pela região aromática (anel A) quanto por parte do anel B do fármaco. Os dados de ITC, para esse sistema, apresentaram coeficientes estequiométricos fracionados, sugerindo a existência de diferentes estequiometrias em solução, logo, pode-se supor que tanto compostos com diferentes formas de inclusão quanto com diferentes estequiometrias coexistem em solução.

Adicionalmente, fazendo um comparativo entre a quantidade e a intensidade das manchas de correção presentes no mapa de correlação 2D-ROESY dos dois sistemas em estudo, observa-se menores interação entre o BPR e a HP $\beta$ CD. Logo, os experimentos de RMN confirmam a existência de maiores interações entre o BPR e a  $\beta$ CD, o que corrobora com os dados de ITC que mostram interações mais fortes para o sistema envolvendo a  $\beta$ CD, considerando os altos valores de  $K_a$  para esse sistema quando comparados aos do sistema envolvendo a HP $\beta$ CD.



**Figura 3.29** – Mapa de correlação de RMN 2D-ROESY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  do composto de inclusão HP $\beta$ CD:BPR a 600 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , com as respectivas atribuições dos principais sinais de hidrogênio.

# **CAPÍTULO 4**

## **CONCLUSÕES**

## 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos composto de inclusão formados pelo fármaco BPR e as moléculas de  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD. Esses compostos foram caracterizados por diferentes técnicas em solução, as quais foram imprescindíveis para a determinação da termodinâmica envolvida no processo de formação dos sistemas e também da compreensão dos sítios de interação entre as espécies químicas.

Os estudos termodinâmicos mostraram que o processo de formação dos compostos de inclusão,  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, é espontâneo, mesmo em diferentes temperaturas, porém, o primeiro é favorecido pela entalpia enquanto que o segundo é favorecido entropicamente. Quanto a estequiometria, os resultados de ITC mostraram uma relação de 1:1 para o sistema  $\beta$ CD:BPR, enquanto que para o sistema HP $\beta$ CD:BPR foram obtidos valores fracionados dos coeficientes estequiométricos e estes sugerem que compostos de inclusão com diferentes estequiometrias coexistem em equilíbrio.

Também foi possível verificar que as constantes de associação estimadas por ITC para o sistema  $\beta$ CD:BPR apresentaram valores elevados, sendo estes consideravelmente maiores que as estimadas para o sistema HP $\beta$ CD:BPR, sugerindo que o fármaco BPR interage mais fortemente com a  $\beta$ CD do que com a HP $\beta$ CD. O que foi confirmado pelos experimentos de RMN, que mostraram correlações a curta distância em maiores quantidades e mais intensas para o sistema envolvendo a  $\beta$ CD.

Adicionalmente, os estudos de solubilidade indicaram que os compostos de inclusão,  $\beta$ CD:BPR e HP $\beta$ CD:BPR, possuem solubilidade superior à do fármaco BPR livre, mostrando que a inclusão de BPR com ambas CDs pode promover um aumento na solubilidade desse fármaco. Esses dados são interessantes no contexto de aplicação das CDs como excipientes na melhoria de formulações farmacêuticas de baixa solubilidade em água.

Assim, os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que embora a  $\beta$ CD possua interações mais fortes com o BPR do que a HP $\beta$ CD, o fármaco BPR forma compostos de inclusão tanto com a  $\beta$ CD quanto com a HP $\beta$ CD, e ambas são capazes de aumentar a solubilidade desse fármaco. Conforme discutido, a inclusão de fármacos com baixa solubilidade em água com CDs pode aumentar a sua solubilidade e por consequência ocorre um aumento da sua biodisponibilidade, melhorando a eficácia do medicamento. Além disso, a inclusão pode

proporcionar uma redução dos efeitos colaterais associados a administração por via oral que esse fármaco apresenta. Logo, os dois sistemas estudados são promissores para futuros teste biológicos, os quais poderão verificar a citotoxicidade desses compostos e a aplicabilidade dos mesmos como novos dispositivos de liberação.

**CAPÍTULO 5**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINETON®. [BULA]. Rio de Janeiro: Laboratórios Bagó do Brasil S.A., 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. Resolução da Diretoria colegiada – RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Ed. 141, Seção 1, p. 87 – 89, 2017.

BAI, H. et al., Cyclodextrin-based host-guest complexes loaded with regorafenib for colorectal cancer treatment. **Nature Communications**, v. 12, p. 1–18, 2021.

BASTOS, M.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. Isothermal titration calorimetry (ITC): a standard operating procedure (SOP). **European Biophysics Journal**, v. 50, p. 363 – 371, 2021.

BOUCHEMAL, K. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 960 – 972, 2008.

BOUCHEMAL, K. et al., A comprehensive study on the inclusion mechanism of benzophenone into supramolecular nanoassemblies prepared using two water-soluble associative polymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 98, p. 57 – 64, 2009.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645 – 666, 2007.

COUTO, S. A.; SALÚSTIO, P.; CABRAL-MARQUES, H. Cyclodextrins. **Polysaccharides**, p. 1 – 36, 2014.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12 p. 1023–1035, 2004.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DENADAI, A. M. L. et al. Self-assembly Characterization of the  $\beta$ -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: NMR, Phase Solubility, ITC and QELS. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, p. 41 – 49, 2004.

DENADAI, A. M. L. et al. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2286 – 2296, 2007.

DE PAULA, E. E. B. et al. Insights into the multi-equilibrium, superstructure system based on  $\beta$ -cyclodextrin and a highly water soluble guest **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 207–215, 2012.

DE PAULA, W. X. et al. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl- $\beta$ -CD: ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry and anti-hypertensive studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 116 – 123, 2011.

DE SOUSA, F. B. et al. Supramolecular Self-Assembly of Cyclodextrin and Higher Water Soluble Guest: Thermodynamics and Topological Studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 26, p. 8426–8436, 2008.

DODZIUK, H., Introduction to Supramolecular Chemistry. New York: Kluwer Academic Publishers. 350, 2002.

EGYED, O. Spectroscopic studies on beta-cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 1, p. 225–227, 1990.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Council of Europe - (EDQM), 9 ed, 2017.

FERNANDES, V. C. et al. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- $\beta$ -

ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 543 – 553, 2007.

FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 295 – 299, 2004.

FREIRE, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 869 – 874, 2008.

FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M. Isothermal Titration. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 950 – 959, 1990.

GONTIJO, S. M. L. et al. Erlotinib/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 83, p. 267 – 279, 2015.

GRDADOLNIK, J. ATR-FTIR Spectroscopy: its advantages and limitations. **Acta Chimica Slovenica**, v. 49, p. 631 – 642, 2002.

HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035–2044, 1998.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase-Solubility Techniques. **Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation**, v. 4, p. 117–212, 1965.

INOUE, Y. et al. Thermodynamics of Molecular Recognition by Cyclodextrins. 1. Calorimetric Titration of Inclusion Complexation of Naphthalenesulfonates with  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Cyclodextrins: Enthalpy-Entropy Compensation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 475 – 481, 1993.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 147 – 162, 1997.

KATSUHIKO, A.; KUNITAKE, K. Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications. Leipzig: Springer-Verlag Heidelberg. 208, 2006.

KHAN, A. R. et al. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. **Chemical Review**, v. 98, n. 5, p. 1977– 1996, 1998.

KLOTZ, I. M.; ROSENBERG, R. M. Chemical Thermodynamics - Basic Theory and Methods. Sixth. 563, 2008.

KRUG, R. R.; HUNTER, W. G.; GRIEGER, R. A. Statistical interpretation of enthalpy-entropy compensation. **Nature**, v. 261, p. 566 – 567, 1976.

KOLESNICHENKO, I. V.; ANSLYN, E. V. Practical applications of supramolecular chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 9, p. 2385–2390, 2017.

KUZ'MINA et al. Development of a procedure for identification of biperiden hydrochloride with specificity for triperiden hydrochloride. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 51, n. 12, p. 1106–1110, 2017.

LA MATTINA, J. C; GOLAN, D.E. Farmacocinética. *In*: GOLAM, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia**: A base fisiopatológica da farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 28–45.

LOFTSSON, T; MÁSSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15–30, 2001.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; BREWSTER, M. E. Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1091–1099, 2004.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1–11, 2007.

LOFTSSON, T. et al. Carvedilol: Solubilization and Cyclodextrin Complexation: A Technical Note. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 2, p. 425 – 430, 2008.

LENH, J. M. Cryptates: Inclusion Complexes of Macropolycyclic Receptor Molecules. **Pure and Applied Chemistry**, v. 50, p. 871–892, 1978.

LIU, L; GIO, Q.X. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 42, p. 1 – 14, 2002.

MEIRA, L. H. R. et al. Thermodynamic compatibility between cyclodextrin supramolecular complexes and surfactant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 544, p. 203–212, 2018.

MOURA, C. A. S. et al. Structural and thermodynamic investigation of pentoxifyllinecyclodextrin in. **Chemical Physics Letters**, v. 682, p. 43 – 48, 2016.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238 – 250, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113 p. 226 – 238, 2015.

NAMGUNG, R. et al. Poly-cyclodextrin and poly-paclitaxel nano-assembly for anticancer therapy. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–12, 2014.

NELSON, M. V.; BERCHOU, R. C.; LEWITT, P. A. Parkinson's Disease. *In*: DIPIRO, J. et al. (Ed.) **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**. New York: McGraw-Hill Companies, 2005. p. 1075–1088.

PADURARU, O. M. et al. Effect of Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin on the Solubility of an Antiarrhythmic Agent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2174 – 2181, 2013.

PASSOS, J. J. et al. Multi-equilibrium system based on sertraline and  $\beta$ -cyclodextrin supramolecular complex in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, p. 24 – 33, 2011.

PASSOS, J. J. et al. In vivo evaluation of the highly soluble oral  $\beta$ -cyclodextrin–Sertraline supramolecular complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 24–33, 2012.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à espectroscopia. 4<sup>a</sup> Edição. Cengage Learning. 716, 2010.

REKHARSKY, M. et al. Ion-Pairing Molecular Recognition in Water: Aggregation at Low Concentrations That Is Entropy-Driven. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 14959 – 14967, 2002.

REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1875 – 1917, 1998.

SANTOS, et al. Cyclodextrin-based delivery systems for in vivo-tested anticancer therapies. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, p. 49 – 71, 2021.

SCHNEIDER, H. J. et al. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1755–1785, 1998.

SONG, C.; ZHANG, S.; HUANG, H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. **Frontiers in MICROBIOLOGY**, v. 6, p. 1049 – 1066.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. *In: GOLAM, D. E. et al. Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 166–185.

STOJANOV, M.; WIMMER, R.; e LARSEN, K. L. Study of the Inclusion Complexes Formed Between Cetirizine and  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Cyclodextrin and Evaluation on Their Taste-Masking Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3177–3185, 2011.

SUÁREZ, D. F. et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ $\beta$ -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 194 – 201, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Review**, v. 98, p. 1743 – 1753, 1998.

SZEJTLI, J. Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1825 – 1845, 2004.

TONNESEN, H. H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 127 – 135, 2002.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the Value of  $c$ : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859 – 14866, 2003.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 1998.

WISEMAN, T. et al. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 179, p. 131 – 137, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neurological disorders: public health challenges. Geneva: WHO, 2006.

ZHOU, P. et al. Glutamine- $\beta$ -cyclodextrin for targeted doxorubicin delivery to triple-negative breast cancer tumors via the transporter ASCT2. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 5367–5375, 2019.